
Aus der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Tim Pohlemann

Einfluss von Erythropoietin auf die Frakturheilung im murinen Ischämiemodell

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2019

Vorgelegt von: David Osche
Geboren am: 10.11.1989 in Kaiserslautern

Tag der Promotionsprüfung: 05.12.2019

Dekan: Prof. Dr. M. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. T. Histing

Prof. Dr. M. Glanemann

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung / Abstract	3
2 Einleitung.....	5
2.1 Knochen	5
2.1.1 Morphologie	5
2.1.2 Histologie	5
2.1.3 Funktion	7
2.2 Frakturheilung.....	7
2.2.1 Primäre Frakturheilung	8
2.2.2 Sekundäre Frakturheilung	8
2.3 Wachstumsfaktoren	10
2.3.1 BMP (Bone morphogenetic protein).....	10
2.3.2 CD31 (Cluster of differentiation 31)	10
2.3.3 CYR61 (Cysteine-rich angiogenic inducer 61)	10
2.3.4 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	10
2.3.5 OPG (Osteoprotegerin)	11
2.3.6 RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand)	11
2.4 Frakturmodelle.....	11
2.4.1 Großtiermodelle.....	12
2.4.1.1 Schaf	12
2.4.1.2 Hund.....	12
2.4.2 Kleintiermodelle.....	13
2.4.2.1 Kaninchenmodell	13

2.4.2.2 Rattenmodell.....	13
2.4.2.3 Mausmodell	13
2.5 Erythropoietin (EPO).....	16
2.5.1 Struktur.....	16
2.5.2 Wirkmechanismus	16
2.5.3 Pharmakokinetik.....	17
2.5.4 Indikation und Anwendung	17
2.5.5 Anwendung im Tiermodell	17
2.5.6 Nebenwirkungen	17
2.6 Zielsetzung	18
2.7 Fragestellung	18
3 Material und Methoden	19
3.1 Methoden.....	19
3.1.1 Studiendesign.....	19
3.1.2 Tiermodell	20
3.1.3 Operationsverfahren.....	20
3.1.4 Medikamentenapplikation.....	26
3.1.5 Tötung der Tiere.....	26
3.1.6 Präparation der Knochen.....	27
3.2 Zielkriterien und Auswertung.....	27
3.2.1 Röntgen.....	27
3.2.2 Biomechanik.....	28
3.2.3 Histologie	29

3.2.3.1 Safranin O-Färbung	30
3.2.4 Micro-CT	31
3.2.5 Western Blot.....	32
3.3 Statistik	33
4 Ergebnisse.....	34
4.1 Röntgen	34
4.2 Biomechanik	34
4.3 Histomorphometrie.....	36
4.4 Micro-CT	38
4.5 Western Blot	41
5 Diskussion	45
5.1 Diskussion der Methoden.....	45
5.2 Diskussion der Ergebnisse.....	49
6 Literaturverzeichnis	55
7 Danksagung.....	66
8 Publikationen.....	68
8.1 Vorträge	68
8.2 Publikationen	68
Abbildungsverzeichnis	69
Tabellenverzeichnis	70

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
Aq. dest.	Aqua destillata
ap	Anteroposterior
AP-1	Aktivator Protein 1
BMP	Bone morphogenetic protein
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CT	Computertomographie
CYR61	Cysteine-rich angiogenic inducer 61
EPO	Erythropoietin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G	Gauge
g	Gramm
H	Wasserstoff
h	Stunde
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
IE	Internationale Einheiten
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
kD	Kilodalton
KF	Korrekturfaktor
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
l	Liter

µm	Mikrometer
mg	Milligramm
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mm ²	Quadratmillimeter
mol	Mol
MSCs	Mesenchymale Stammzellen (engl. Mesenchymal stem cells)
MW	Mittelwert
N	Newton
NaCl	Natriumchlorid
OPG	Osteoprotegerin
PAVK	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PECAM-1	Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
®	eingetragenes Warenzeichen (engl. Registered Trademark)
RANK	Receptor Activator of NF-κB
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
SEM	Standardfehler (engl. Standard Error of the Mean)
s	Sekunden
Tab.	Tabelle
™	Warenzeichen (engl. Trademark)
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
TP	Target-Intensitätspixel
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vs.	versus

1 Zusammenfassung / Abstract

Einfluss von Erythropoietin auf die Frakturheilung im murinen Ischämiemodell

Erythropoietin (EPO) fördert die Blutbildung im Knochenmark und stimuliert die Angiogenese über die Expression von Wachstumsfaktoren wie VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Verschiedene Studien konnten bereits zeigen, dass die Behandlung mit EPO die Frakturheilung verbessert. Dies ist wahrscheinlich auf die erhöhte Expression von angiogenen Wachstumsfaktoren im Kallus zurückzuführen. Ziel dieser Studie war es daher, den Einfluss von EPO auf die Frakturheilung im ischämischen Mausmodell zu untersuchen.

Insgesamt wurden für die Studie 45 CD-1 Mäuse untersucht. Die Ischämie wurde durch die Ligatur der Arteria femoralis superficialis im Bereich der rechten unteren Extremität induziert. Anschließend wurden die Femora geschlossen frakturiert und mit einer intramedullären Kompressionsschraube osteosynthetisch versorgt. Den Tieren wurden täglich 500 IE/kg Körpergewicht EPO intraperitoneal appliziert. Die Kontrollgruppe erhielt die äquivalente Menge Kochsalzlösung. 2 und 5 Wochen postoperativ wurden die Knochen biomechanisch, histologisch, radiologisch (Röntgen, Micro-Computertomographie) sowie mittels Western Blot untersucht. Biomechanisch zeigte sich nach Gabe von EPO 5 Wochen postoperativ eine signifikant höhere Biegesteifigkeit im Vergleich zur Kontrolle. Histologisch konnte sowohl nach 2 Wochen als auch nach 5 Wochen ein signifikant höherer Anteil an Knochengewebe und ein geringerer Anteil an Bindegewebe im Kallus nachgewiesen werden. In der CT-Auswertung zeigte sich 2 Wochen postoperativ nach Gabe von EPO ein größeres Knochenvolumen im Vergleich zur Kontrollgruppe. In den Western Blot Untersuchungen zeigte sich im Kallus der mit EPO behandelten Tiere eine höhere Expression des angiogenen Wachstumsfaktors CYR61 (Cysteine-rich angiogenic inducer 61) sowie von OPG (Osteoprotegerin) und RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand). Interessanterweise hatte die Behandlung mit EPO keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von VEGF.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Behandlung mit Erythropoietin den Remodelingprozess beschleunigt und die Frakturheilung signifikant verbessert.

The influence of erythropoietin on fracture healing in an ischemic murine model

Erythropoietin (EPO) induces hematopoiesis in the bone marrow and stimulates angiogenesis through expression of different growth factors. Former studies could show that the treatment with EPO improves fracture healing. This might be due to an increased expression of angiogenic growth factors in the fracture callus. Therefore, we studied the influence of EPO on fracture healing in an ischemic murine fracture model.

In this study, a total number of 45 CD-1 mice were used. Ischemia was induced through a ligature of the profound femoral artery in the lower right extremity. A closed fracture of the femora was created and stabilized using an intramedullary compression screw. The animals received 500 IE/kg bodyweight EPO intraperitoneally daily. The control group received an equivalent amount of saline solution. 2 and 5 weeks after fracture, the bones were analyzed using biomechanical, histological, radiological (x-ray, Micro-CT) and Western Blot methods. Biomechanical analysis at 5 weeks after fracture showed a significantly higher bending stiffness after treatment with EPO compared to the control group. Histologically, the amount of bone tissue was significantly higher and the amount of fibrous tissue was significantly reduced in the EPO treated animals 2 and 5 weeks after fracture. The micro-CT-analysis showed also a higher bone volume in the callus after EPO treatment at 2 weeks after fracture compared to the controls. The Western Blot analysis showed a higher expression of the angiogenic growth factor CYR61 (Cysteine-rich angiogenic inducer 61) and OPG (Osteoprotegerin) / RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand). Interestingly, EPO did not effect the expression of VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor).

In conclusion, the treatment with EPO accelerates the remodeling process and improves fracture healing in an ischemic fracture model.

2 Einleitung

2.1 Knochen

2.1.1 Morphologie

Knochen lassen sich bezüglich ihrer jeweiligen Form unterteilen in lange Knochen beziehungsweise Röhrenknochen, kurze Knochen (Handwurzelknochen, Fußwurzelknochen), platte Knochen (Schädeldach, Brustbein, Schulterblatt, Hüftbein) sowie unregelmäßig geformte Knochen (Wirbel, Rippen, Knochen der Schädelbasis) [3]. In der vorliegenden Studie wurde das Femur gewählt, welches zu den Röhrenknochen gezählt wird. Das Femur bildet in seinem proximalen Anteil, zusammen mit dem von den Beckenknochen gebildeten Acetabulum, das Hüftgelenk. Distal bildet es zusammen mit Tibia und Fibula das Kniegelenk. Der Knochen wird unterteilt in den gelenkbildenden Teil der Epiphyse. Zum Schaft hin schließt sich die Metaphyse an, welche dann in die Diaphyse übergeht [107]. Die Frakturierung der Knochen erfolgte in der Diaphyse in Schaftmitte. Bereits makroskopisch lassen sich die äußere Substantia compacta und innenliegende Spongiosa unterscheiden [107].

2.1.2 Histologie

Knochengewebe besteht aus verschiedenen Zelltypen. Die mineralisierte Extrazellulärmatrix besteht aus Kollagenfibrillen (organische Komponente) und Hydroxylapatitkristallen (anorganische Komponente) [112]. Damit besteht Knochen zu 45 % aus Mineralien (Hydroxylapatit), zu 30 % aus organischem Material (Kollagen) und zu 20 % aus Wasser.

Auf zellulärer Ebene lassen sich die am Knochenaufbau beteiligten Osteoblasten von den knochenabbauenden Osteoklasten unterscheiden. Im Anschluss an die Knochenmatrix-Synthese differenzieren sich die Osteoblasten zu Osteozyten aus, die den prozentual größten Anteil am differenzierten Knochengewebe ausmachen.

Zu unterscheiden sind die beiden Knochenformen des Geflechtknochens und Lamellenknochens. Bei Ersterem, der bei der Knochenbildung im Rahmen desmalen und enchondraler Ossifikation sowie in der Frühphase der Frakturheilung entsteht, imponieren die Kollagenfibrillen als ungeordnete Bündel. Durch Umbauprozesse entwickelt sich Lamellenknochen, der den überwiegenden Anteil bei erwachsenen Menschen darstellt. Die Kollagenfibrillen sind hierbei schichtweise in Lamellensystemen angeordnet, unter denen man zwischen äußeren und inneren Generallamellen, Speziallamellen und Schaltlamellen unterscheiden kann [112].

Den Hauptbestandteil des Knochens, die sogenannte Substantia compacta, bilden die Osteone, die zylindrisch aufgebaut sind und in Längsrichtung des Knochens verlaufen. Der in ihrem Inneren zentral gelegene, Blutgefäße führende Kanal wird als Havers-Kanal bezeichnet. Die Blutgefäße werden aus den von außen in den Knochen eintretenden Arteriae nutritiae gespeist. Umgeben werden die Havers-Kanäle von konzentrisch angeordneten Speziallamellen. Die Osteone untereinander wiederum sind durch die Linea cementalis voneinander abgegrenzt [112].

Zwischen den Lamellen liegen die Osteozyten in den länglichen Lakunen, von denen Canaliculi abgehen, in welche Lamellen eindringen. Diese stehen zusätzlich mit dem System aus Havers-Kanälen in Verbindung. Die vorgenannten Canaliculi stellen zudem ein Netzwerk zwischen den einzelnen Lakunen her. Die Osteozyten bilden über dieses verzweigte System untereinander Zellkontakte aus, sogenannte Nexus. Somit dient das System der Canaliculi zum Austausch der Osteozyten untereinander sowie zur Diffusion von verschiedenen Substanzen. Die zwischen den Osteonen liegenden Lamellenreste werden als Schaltlamellen bezeichnet, die keine Blutgefäße führen.

Volkman-Kanäle verlaufen im Gegensatz zu den Havers-Kanälen in Querrichtung und durchbrechen somit das Lamellensystem. Dadurch entsteht eine Verbindung des Gefäßsystems der Havers-Kanäle untereinander sowie zu den Gefäßen des Periosts. Durch das weit verzweigte Gefäßsystem wird die Ernährung des Knochens gewährleistet, welche eine entscheidende Bedeutung für dessen Auf- und Abbau hat. Die äußeren und inneren Generallamellen umgeben das System, nach außen schließt sich das Periost an, welches aus drei Schichten besteht. Die Adventitia liegt außen auf und führt Gefäße, die über die Volkman-Kanäle in die Tiefe des Knochens verlaufen. Nach innen schließt sich das Stratum fibrosum an, welches aus straffem Bindegewebe und elastischen Fasern besteht. Die innerste Schicht, das Stratum osteogenicum (Kambiumschicht), enthält drei verschiedene Zelltypen: Osteoprogenitorzellen, mesenchymale Stammzellen (MSCs) und Präosteoblasten. Osteoprogenitorzellen können sich zu Präosteoblasten differenzieren. Präosteoblasten sind, anders als Osteoblasten, noch teilungsfähig.

Die Innenflächen von Substantia compacta, der Havers-Kanäle sowie des Trabekelwerks werden von Endost ausgekleidet. Es enthält ruhende Osteoblasten und Osteoklasten, welche zu Umbau- und Regenerationszwecken aktiviert werden können [112].

Im Gegensatz zum menschlichen Knochen ist der Knochenaufbau der Maus primitiver. Anstelle des Havers-Systems besitzt die Maus sogenannte

Resorptionskanäle. Von diesen Resorptionskanälen geht die Knochenheilung durch Osteoblasten aus [76].

2.1.3 Funktion

Der Knochen dient als Stützapparat des Körpers und verleiht ihm Struktur. Zusätzlich ist er in der Lage, eine äußere Krafteinwirkung innerhalb von Grenzen, welche durch seine Biegesteifigkeit und Elastizität gegeben sind, auszugleichen und abzufangen. Als Kalziumspeicher ist er aktiv an Stoffwechselprozessen beteiligt [112].

Knochen besitzt die Fähigkeit zum Längen- und Breitenwachstum, was als Modeling bezeichnet wird. Auch über die (Länge-)Wachstumsphase des menschlichen Körpers hinaus, welche durch den Schluss der im Bereich zwischen Metaphyse und Epiphyse definierten Epiphysen- oder auch Wachstumsfuge gegeben ist, bleibt er weiter im Sinne eines Remodelings aktiv. Dieser Vorgang ist gekennzeichnet durch stetige Resorption und erneuten Aufbau von Knochengewebe. Somit ist Knochen in der Lage, sich an wechselnde Stoffwechsel- und Belastungsbedingungen anzupassen. Hierbei sind neben den Osteoblasten und Osteoklasten sowie deren jeweiligen Vorläuferzellen verschiedene Zellen aus Endost, Periost und Havers-System beteiligt [112].

2.2 Frakturheilung

Als Frakturheilung bezeichnet man die Fähigkeit des Knochens zur Regeneration im Sinne der Wiederherstellung seiner strukturellen Kontinuität. Bemerkenswert an der Knochenheilung ist, dass die Ausheilung, im Gegensatz zu den meisten Heilungsprozessen des Körpers, ohne die Bildung von Narbengewebe erfolgt [74]. Die erfolgreiche Frakturheilung ist abhängig von diversen Einflussfaktoren, wie einer adäquaten Ruhigstellung, ausreichendem Kontakt der Fraktarenden zueinander sowie einer suffizienten Vaskularisierung. Weitere Einflussfaktoren sind Alter, Lokalisation und Schweregrad der Fraktur, Knochenstruktur, Wahl des Osteosyntheseverfahrens sowie Medikamente, Nikotin, Alkohol und Stoffwechselerkrankungen. Prinzipiell kann man zwischen zwei Arten der Knochenheilung unterscheiden: der primären und sekundären Knochenheilung.

2.2.1 Primäre Frakturheilung

Die primäre oder direkte Frakturheilung ist nur über eine anatomisch korrekte Reposition der Fraktur, welche direkten Kontakt der Frakturende gewährt und mittels stabiler Osteosynthesetechniken erzeugt wurde, zu erreichen. Somit kommt sie im Rahmen eines natürlichen Heilungsprozesses nicht vor. Es bildet sich direkt lamellarer Knochen ohne die Bildung einer Knorpelvorstufe [71].

2.2.2 Sekundäre Frakturheilung

Die sekundäre Frakturheilung, auch indirekte Frakturheilung, ist die vorherrschende Form der Knochenheilung, bei der es sowohl eine enchondrale als auch eine intramembranöse Komponente gibt. Zur indirekten Frakturheilung kommt es sowohl bei der konservativen, nicht-operativen Behandlung als auch bei der operativen Versorgung mit Implantaten, die eine gewisse Bewegung im Frakturspalt zulassen (zum Beispiel intramedulläre Nagelosteosynthese). Die indirekte Frakturheilung lässt sich in 6 Phasen unterteilen [71,74]:

- Entzündungsphase
- Rekrutierung von MSCs
- Entstehung eines knorpeligen und periostalen, knöchernen Kallus
- Revaskularisation und Neoangiogenese im Bereich der Fraktur
- Mineralisierung und Resorption des kartilaginären Kallus
- Phase des Umbaus (Remodeling)

Im Bereich der Fraktur entsteht zunächst ein Hämatom, welches Zellen aus peripherem und intramedullärem Blut sowie Stammzellen aus dem Knochenmark enthält. Im Zuge einer initialen akuten Entzündungsreaktion erfolgt die Expression der proinflammatorischen Faktoren Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) sowie der Interleukine 1 (IL-1), IL-6, IL-11 und IL-18. Die erhöhte Zellteilung im Zuge der inflammatorischen Antwort breitet sich zunächst über die gesamte Länge des verletzten Knochens aus, bevor sie innerhalb weniger Tage regredient ist und sich fortan in unmittelbarer Umgebung des Kallus lokalisiert. Dort zeigen sich über Wochen Anzeichen erhöhter Zellteilung. Die vorgenannten Prozesse beschränken sich auf das Periost sowie das

unmittelbar die beiden Fraktarenden umgebende Gewebe. Die Knochenenden an sich werden nicht einbezogen, sie haben keinerlei Stoffwechselleistung mehr [71]. Diese wichtige Beobachtung lässt die Schlussfolgerung zu, dass beide Fraktarenden nur indirekt an der Wiedervereinigung des Knochens beteiligt sind, vielmehr läuft der Prozess der Überbrückung des Frakturspaltes zwischen den etwas weiter von der Fraktur entfernten, intakten Abschnitten des Knochens ab.

Ein Charakteristikum der indirekten Frakturheilung ist die Bildung eines weichen Kallus, der den Frakturspalt umgibt und welcher zunächst hauptsächlich aus Knorpel- und Bindegewebszellen besteht. In der Peripherie des Kallus bildet sich teilweise Knorpelgewebe als späterer Bestandteil des Prozesses der enchondralen Ossifikation, begleitet von der Bildung von Blutgefäßen. Innerhalb der ersten 7–10 Tage des Heilungsprozesses kann die Bildung von Geflechtknochen beobachtet werden, welcher sich an die Fraktarenden anlegt. Im bereits gebildeten Knorpelgewebe kommt es etwa 10–14 Tage nach Beginn der Frakturheilung zu biochemischen Prozessen, welche zur Vorbereitung auf die Kalzifikation des Knorpels dienen. Den Frakturkallus kann man in dieser Phase in einen weichen und einen harten Anteil gliedern, wobei in letzterem die intermembranöse Ossifikation stattfindet. Dort schreitet der Prozess der enchondralen Ossifikation fort. Dies geschieht zunächst durch Zellteilung proliferativer Chondrozyten, wobei dieser Prozess ab dem 9. Tag zum Stillstand kommt, sodass vornehmlich hypertrophe Chondrozyten zu finden sind. Diese tragen zur Kalzifikation des neu geformten Knorpels bei. In der Folge beginnen Entstehung und Einsprießung von Blutgefäßen in den Kallus, wobei diese von perivaskulären Zellen begleitet werden, die als Progenitorzellen von Osteoblasten fungieren. Im weiteren Verlauf wird das kalzifizierte Knorpelgewebe durch Geflechtknochen ersetzt. Nach etwa 14 Tagen, sobald der Frakturspalt knöchern überbrückt ist, wird der nun vollständig aus Geflechtknochen bestehende Frakturkallus einem Remodelingprozess unterworfen, in dessen Verlauf sich eine lamellare Struktur ausbildet [71,74].

In einem Mineralisierungs- und Resorptionsprozess erfolgt eine Umwandlung über kalzifizierten Knorpel hin zu Knochengewebe. Hierdurch wird der Knochen fester und mechanisch stabiler [71].

2.3 Wachstumsfaktoren

2.3.1 BMP (Bone morphogenetic protein)

Die BMPs gehören zur Superfamilie der TGF- β (Tumornekrosefaktor- β). Entdeckt wurden sie im Rahmen von Tierversuchen, wo sie nach intramuskulärer Injektion ektopische Knochenbildung induzieren konnten [55]. Sie sind an der Chondrogenese sowie entscheidend an der enchondralen Knochenbildung beteiligt. Nicht zuletzt spielen sie eine signifikante Rolle bei der Differenzierung mesenchymaler Zellen zu Osteoblasten sowie im weiteren Verlauf bei der Apoptose reifer Osteozyten [35]. Der Nutzen von BMPs für die Frakturheilung wurde in mehreren experimentellen als auch klinischen Studien nachgewiesen [55,63].

2.3.2 CD31 (Cluster of differentiation 31)

CD31, auch Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1), ist ein Signalmolekül, welches die Adhäsion von Zellen untereinander vermittelt. Dadurch garantiert es für eine intakte zelluläre Permeabilitätsbarriere und kann, im Falle einer Unterbrechung eben dieser, deren Regeneration induzieren [58]. Da kleine Blutgefäße durch Endothelzellen ausgekleidet werden und diese wiederum PECAM exprimieren, kann das Signalmolekül als Marker für die Angiogenese verwendet werden [65]. Der Marker wird in Studien zur Untersuchung der Angiogenese häufig verwendet [67].

2.3.3 CYR61 (Cysteine-rich angiogenic inducer 61)

CYR61 gehört zu einer Familie aus matrizellulären Proteinen, welche an interzellulären Signalkaskaden beteiligt sind. CYR61 spielt eine wichtige Rolle in der frühen Phase der enchondralen Ossifikation und hat eine große Bedeutung für die Chondro- und Angiogenese [35,61]. In mehreren Studien wurde eine Expression des Proteins während der Frakturheilung und eine Rolle bei der Bildung von Knorpel und Knochen beschrieben [30]. Es zeigte sich zudem ein positiver Einfluss auf die Regeneration des Kallus, welcher anhand histologischer, röntgenologischer und biomechanischer Parameter belegt werden kann [90].

2.3.4 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

VEGF ist ein Protein aus einer Gruppe von Signalmolekülen, welche eine wichtige Funktion in der Aktivierung der Angiogenese, Vaskulogenese und Lymphangiogenese spielen [35]. Zu dieser Gruppe gehören insgesamt 4 beschriebene Proteine, denen jeweils unterschiedliche, spezifische Funktionen

zugeordnet werden (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D). Die Bildung von VEGF wird durch Hypoxie angeregt. VEGF wird als Marker der Angiogenese verwendet [43].

2.3.5 OPG (Osteoprotegerin)

OPG ist ein Cytokin-Rezeptor aus der Familie der Tumornekrosefaktoren und fungiert als Bindungsstelle für RANKL. Die Erstbeschreibung stammt aus dem Jahr 1997 und steht in Verbindung mit der Entdeckung von RANKL [98]. OPG ist in der Lage, den Tumornekrosefaktor NF- κ B zu hemmen und somit die durch diesen getriggerte Immunantwort und Entzündungsreaktion zu vermeiden. Gleichzeitig wird so die Differenzierung von monoklonalen Osteoklasten-Vorläuferzellen zu Osteoklasten inhibiert und eine Regulierung des Knochenstoffwechsels beziehungsweise Knochenabbaus erreicht [35]. Während der Knochenheilung kann ein wechselndes, unterschiedliches Verhältnis von RANKL und OPG beobachtet werden. Sowohl RANKL als auch OPG sind nachweislich Schlüsselfaktoren während des Remodelingprozesses im Verlauf der Frakturheilung [10,20,57,98]. Ein Ungleichgewicht beider Faktoren kann zu einer gestörten Knochenheilung führen [51].

2.3.6 RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand)

RANKL ist ein Protein und gehört zur Familie der Tumornekrosefaktoren. Seine Entdeckung geht ebenfalls auf das Jahr 1997 zurück [2]. Der Ligand wird durch Osteoblasten sezerniert und aktiviert die Differenzierung von monoklonalen Osteoklasten-Vorläuferzellen zu Osteoklasten. Osteoklasten sind am Knochenabbau beteiligt [78]. Das RANKL/RANK-System reguliert den Knochenstoffwechsel und sorgt für ein Gleichgewicht zwischen Knochenbildung und dessen Abbau [35].

2.4 Frakturmodelle

Die Knochenheilung ist ein komplexer Prozess, für dessen Verständnis es unerlässlich ist, neben den biomechanischen Einflüssen, auch diverse Stoffwechselprozesse der umgebenden Gefäße, Muskulatur und des Bindegewebes, auch auf molekularer Ebene, zu untersuchen [25]. Hierbei bieten Tiermodelle einen entscheidenden Vorteil gegenüber in vitro-Modellen oder speziellen Computersimulationen. In den vergangenen Jahren wurden letztere jedoch stetig verbessert, was entscheidend darauf zurückzuführen ist, dass den Simulationen ein immenser Datensatz bezüglich aller beteiligter Faktoren zugrunde liegt, welcher maßgeblich aus tierexperimentellen Studien gewonnen werden konnte [25,109]. In

einer Übersichtsstudie haben Ghiasi et al. im Jahr 2017 [25], basierend auf der bisherigen Studienlage, einen aktuellen Überblick über die Möglichkeiten der Simulation von Knochenheilung zusammengefasst. Die Arbeit verdeutlicht, dass Faktoren wie Biologie der Frakturheilung, Wachstumsfaktoren und mechanische Einflüsse bereits Eingang in diverse Simulationsalgorithmen gefunden haben und somit die Genauigkeit von Simulationsmodellen entscheidend verbessert werden konnte. Die Autoren geben auf Grund ihrer Recherche aber auch zu bedenken, dass der Einfluss von Wachstumsfaktoren, den Mechanismen der Zellaktivität sowie der Angiogenese noch nicht in die gängigen Modelle implementiert werden konnte. Diese Tatsache unterstreicht weiterhin die Notwendigkeit der in vivo-Modelle zur Analyse der Knochenheilung.

Im Rahmen von experimentellen Studien kommen mittlerweile eine Vielzahl an Modellen zum Einsatz [82]. In einer Analyse untersuchten Martini et al. [72] insgesamt 21.500 Studien zur Frakturheilung an Versuchstieren und zeigten, dass, in absteigender Reihenfolge, in den meisten Fällen Ratten, Mäuse und Hasen zum Einsatz kamen. Als Großtiermodelle werden vor allem Hunde, Primaten, Schafe, Schweine und Katzen verwendet.

2.4.1 Großtiermodelle

2.4.1.1 Schaf

Schafe weisen wie der Mensch kortikalen und spongiösen Knochen auf und haben eine vergleichbare Heilungsrate. Zudem unterliegen die Knochen, ähnlich wie beim Menschen, einem steten Remodelingprozess. Im Vergleich zum Menschen weisen sie weniger Haverskanäle sowie eine andere Knochenzusammensetzung auf [1,81,89]. Die Tierhaltung, der Versuchsaufbau und die Implantate sind aufwendiger beziehungsweise kostspieliger. Von Vorteil ist sicherlich die Größe des Knochens. So können Implantate, welche beim Menschen Anwendung finden, auch im Schafmodell verwendet werden.

2.4.1.2 Hund

Die Knochen des Hundes sind denen des Menschen in Zusammensetzung und Aufbau sehr ähnlich. Der Ablauf der Remodelingprozesse unterscheidet sich allerdings grundlegend von denen des Menschen. Zusätzlich weisen Hunde eine Kombination aus lamellarem und plexiformem Knochen auf, deren biomechanische Eigenschaften sich von denen menschlicher Knochen unterscheiden [56,89,110].

2.4.2 Kleintiermodelle

2.4.2.1 Kaninchenmodell

Der Knochen von Kaninchen unterläuft einem raschen Remodelingprozess. Er weist zudem eine unterschiedliche Struktur im Vergleich zum menschlichen Knochen auf. Vorteile im Vergleich zu Mäusen und Ratten ist ein relativ großes Skelett. Die Haltung der Tiere ist nicht viel aufwendiger als bei anderen Kleintiermodellen. Im Vergleich zu den deutlich größeren Schafen und Hunden jedoch ist die Auswahl der zur Verfügung stehenden Implantate begrenzt [76,89,110].

2.4.2.2 Rattenmodell

Ratten weisen lamellaren Knochen auf, dessen Remodeling sowohl des kortikalen als auch des spongiösen Knochens mit dem des Menschen vergleichbar ist. Unterschiede ergeben sich jedoch in Zusammensetzung, Knochendichte und Knochenqualität. Die meisten Studien zur Untersuchung der Knochenheilung verwenden das Femur, die Tibia oder auch den Schädelknochen. In der Tierhaltung ist die Ratte ebenfalls wenig aufwendig. Mehrere Weibchen können problemlos zusammen in einem großen Käfig gehalten werden [76,89,110].

2.4.2.3 Mausmodell

Das Mausmodell wird mittlerweile sehr häufig zur Untersuchung der Frakturheilung verwendet [13,28,40,47,70]. Die verzögerte Etablierung, speziell im Vergleich zum Rattenmodell, ist auf die höheren Anforderungen bei der Entwicklung der Implantate sowie entsprechender Osteosynthesetechniken zurückzuführen.

Der entscheidende Vorteil des Mausmodells ist die vollständige Entschlüsselung des Genoms [76]. So stehen neben verschiedenen Knockout-Mäusen eine Vielzahl an kommerziell verfügbaren monoklonalen Antikörpern zur Verfügung [8,76]. Gerade auf dem Gebiet der Frakturheilung können so molekulare Pathomechanismen während der Frakturheilung untersucht werden.

Zur Untersuchung der Frakturheilung werden, je nach Fragestellung, verschiedene Modelle verwendet. Rippenmodelle werden vor allem zur Untersuchung der Genexpression verwendet. Auf Grund der Größe und Form ist der Knochen schwieriger zu stabilisieren und kann nicht standardisiert biomechanisch getestet werden [8,76].

Das Tibiamodell ist ein etabliertes Modell [41]. Die Fraktur wird meistens mit einem intramedullären Nagel stabilisiert. Nachteile des Verfahrens sind die fehlende axiale Stabilität sowie die Rotationsinstabilität. Zusätzlich muss bei der Frakturerzeugung darauf geachtet werden, dass die Fibula nicht zusätzlich frakturiert und somit die Biomechanik während des Heilungsprozesses beeinflusst [8,76].

Das Femur der Maus wird aufgrund seiner homogenen Form am häufigsten zur Untersuchung der Frakturheilung verwendet [13,28,40,47,70].

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen offenen und geschlossenen Frakturmodellen. Bei den geschlossenen Modellen wird das Implantat über eine kleine Inzision (minimalinvasiv) eingebracht und der Knochen mit einer Guillotine frakturiert [9]. Offene Modelle ermöglichen durch den größeren operativen Zugang die Erzeugung definierter Osteotomien. Dadurch ist es möglich, die Heilung bei unterschiedlichen Defektgrößen zu untersuchen. Vor allem die Pseudarthrose sowie verschiedene Scaffolds und Materialien auf dem Gebiet des Tissueengineering können untersucht werden. Der offene Zugangsweg erzeugt einen definierten Weichteilschaden, sodass im Rahmen der Frakturierung keine Muskelquetschungen entstehen. Nachteilig ist die Tatsache, dass das Frakturhämatom ausgespült wird und die Heilung durch den größeren Zugang beeinflusst wird. Zudem ist durch die quere Osteotomie eine schlechte Knochenheilung zu erwarten. Die Fraktur muss daher osteosynthetisch stabil versorgt werden.

Die Pin-Clip-Osteosynthese zählt zu den offenen Modellen. Sie bietet eine hohe Stabilität durch die Kombination eines intramedullären Pins mit einem extramedullären Clip. Die Technik ermöglicht dadurch auch die Stabilisierung und Untersuchung segmentaler Knochendefekte [47]. Die Implantate haben ein geringes Gewicht, sind kostengünstig und bieten sowohl axiale Stabilität als auch Rotationsstabilität. Nachteile sind die komplexe Operationstechnik, ein großer, offener Zugang und die zusätzliche Beschädigung des Markraumes beim Einbringen des Pins [8,76].

Der Verriegelungsnagel (Locking nail) besteht aus einem proximalen Gewinde und 2 Löchern, über die die Verriegelungspins eingebracht werden. Auch dieses Verfahren kommt bei der Untersuchung segmentaler Knochendefekte zur Anwendung [41]. Vorteile sind die hohe axiale Stabilität und hohe Rotationsstabilität. Nachteile ergeben sich aus einer aufwendigen chirurgischen Prozedur, einhergehend mit einem Weichteilschaden sowie einer Schädigung des Markraumes. Die Kosten des

Implantates sind darüber hinaus deutlich höher als die der Pin-Clip-Implantate, die selbst hergestellt werden können.

Der Fixateur Externe besteht aus 4 Schanzschrauben, welche in den Knochen eingebracht werden sowie einem externen Fixierelement [41]. Die Untersuchung segmentaler Knochendefekte ist möglich [94]. Die Vorrichtung bietet die Möglichkeit unterschiedlicher Stabilitätsgrade, sodass bei hoher Stabilität die Untersuchung intramembranöser Ossifikation möglich ist [15,94]. Vornehmlich führt der Einsatz des Implantates jedoch zur enchondralen Knochenheilung [105]. Vorteile dieser Technik sind eine hohe Rotationsstabilität und axiale Stabilität, welche variabel eingestellt werden kann. Ein entscheidender Vorteil ist die Tatsache, dass die Implantate entfernt von der Frakturzone eingebracht werden. Die aufwendige, invasive chirurgische Prozedur sowie die hohen Kosten der Implantate sind von Nachteil. Das hohe Gewicht kann das Gangbild der Tiere beeinflussen, was die Heilung zusätzlich negativ beeinflusst [8].

Bei der Plattenosteosynthese wird die Platte durch winkelstabile Schrauben befestigt [39,73]. Die Untersuchung segmentaler Defekte ist möglich. Auf Grund der hohen Stabilität kommt es bei anatomischer Reposition der Fraktur zu intramembranöser Heilung [39]. Von Vorteil sind das geringe Implantatgewicht und die Unversehrtheit des Markraumes. Nachteilig sind die aufwendige Implantation und die hohen Kosten der Implantate [8,76].

Der intramedulläre Pin kann über eine kleine Inzision in den Markraum eingebracht werden. Die Vorteile des Pins sind der minimalinvasive Zugang, das geringe Gewicht sowie die niedrigen Kosten. Die Untersuchung segmentaler Defekte ist nicht möglich. Darüber hinaus liefert das Implantat weder axiale Stabilität noch Rotationsstabilität. Das Risiko für eine Dislokation ist groß. Zudem wird durch das Einbringen der Markraum verletzt [5,8,38,44,53,54,76].

Die intramedulläre Kompressionsschraube (MouseScrew™) besteht aus einem distalen Konus und einem proximalen Gewinde. Dadurch ist die Kompression einer Fraktur in einem geschlossenen Frakturmodell möglich [15,18]. Vorteile gegenüber dem Pin sind eine höhere Rotations- und axiale Stabilität [38]. Die Implantation gelingt über einen minimalinvasiven Zugang. Durch das Einbringen eines intramedullären Führungsdrahtes vor Erzeugung der Fraktur kann eine grobe Frakturdislokation verhindert werden. Das Implantat weist ein geringes Eigengewicht

auf. Nachteilig sind die hohen Implantatkosten und die Schädigung des Markraumes [8,46].

2.5 Erythropoietin (EPO)

EPO ist ein Glykopeptidhormon und als entscheidender Wachstumsfaktor von Erythrozyten an der Hämatopoese beteiligt [49]. Die Synthese des humanen EPO findet zu 85 % in der Niere und zu 15 % in der Leber statt [11]. Miyake et al. [77] waren im Jahr 1977 die ersten, die das Protein aus menschlichem Urin isolieren konnten. Ein Mangel an Sauerstoff in Form eines verminderten Sauerstoffpartialdruckes dient als Trigger für die vermehrte Produktion von EPO in den Nieren und der Leber [35]. Im Falle einer schweren Anämie oder Hypoxämie können die Plasmaspiegel von EPO auf das 100-fache des Ausgangswertes ansteigen. Bereits im Jahre 1990 konnten Eschbach et al. [19] den Nutzen des mittlerweile rekombinanten humanen EPO zur Behandlung von Anämien bei chronischem Nierenversagen belegen und somit dessen klinischen Stellenwert herausstellen. Seine synthetische Herstellung kann in der α - und β -Glykoform erfolgen. Es stehen Epoetin α und Epoetin β zur Verfügung.

2.5.1 Struktur

EPO ist ein zur Zytokin-Familie gehörendes Glykopeptidhormon und besteht aus insgesamt 165 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 34 Kilodalton (kD). Die Sekundärstruktur bilden 4 antiparallele α -Helices. Der Kohlenhydratanteil liegt bei 40 % der Molekülmasse. Während die Aminosäuresequenzen des EPO-Moleküls konstant sind, zeigen sich die Zuckerstrukturen variabel. Die dadurch bedingte sogenannte Mikroheterogenität tritt sowohl im natürlichen als auch im rekombinanten EPO auf und bedingt die unterschiedliche Aktivität und Serumhalbwertszeit des Hormons.

2.5.2 Wirkmechanismus

EPO wirkt über eine Induktion der Erythropoese im Knochenmark. Durch die vermehrte Bildung von Erythrozyten erhöht sich die Sauerstoffbindungskapazität des Blutes [6,35]. Die Regulierung der körpereigenen EPO-Bildung funktioniert über einen negativen Rückkopplungsmechanismus: je niedriger der zelluläre Sauerstoffdruck in den Nierenfibroblasten ist, desto größer ist die Ausschüttung von EPO. Ein entscheidender Mediator in dieser Signalkaskade ist der Transkriptionsfaktor HIF (Hypoxie-induzierter Faktor), welcher bei Hypoxie vermehrt in den Zellen gebildet wird.

2.5.3 Pharmakokinetik

Für ein Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der Erythrozyten im humanen Blutkreislauf braucht ein gesunder Organismus 10–20 Internationale Einheiten (IE) EPO pro Liter Plasma [11,27]. Diese Dosierung reicht nierenkranken Patienten, die zusätzlich auf eine Dialysebehandlung angewiesen sind, nicht aus. Hier werden im klinischen Alltag 3 Mal wöchentlich 35 IE intravenös verabreicht. In der Behandlung von renalen Anämien sollte zusätzlich Eisen oral verabreicht werden.

2.5.4 Indikation und Anwendung

Die Indikation zur Verabreichung von EPO ist nicht alleine auf die renale, hypochrome Anämie von Dialysepatienten beschränkt. Auch bei an Aids erkrankten Patienten, die mit dem Virustatikum Zidovudin behandelt werden, kann es zur Behandlung der daraus häufig resultierenden Anämien eingesetzt werden [19]. Zudem findet EPO auch in der Behandlung von Anämien bei Patientengruppen Anwendung, die aufgrund religiöser Überzeugung eine Transfusion von Blutbestandteilen ablehnen (zum Beispiel Zeugen Jehovas). Missbräuchlich wird EPO zur Steigerung der Leistungsfähigkeit vornehmlich im Radsport angewandt. Da sich der Nachweis aufgrund der körpereigenen Bildung des Hormons oftmals schwierig gestaltet, gilt hier ein Hämatokritwert von 50 % als Grenze zwischen physiologischem Zustand und Doping [6,11,27].

2.5.5 Anwendung im Tiermodell

EPO findet in Tierversuchen zur Untersuchung der Frakturheilung und Wundheilung Anwendung. So führt die systemische Applikation von EPO bei Mäusen zu einer erhöhten Expression des Knochentransformationsmarkers BMP-2 in hämatopoetischen Stammzellen [95]. Zudem induziert EPO die Differenzierung von Stromazellen des Knochenmarks zu Osteoblasten. Mononukleare Zellen des Knochenmarks werden durch EPO zur Formation von Osteoklasten angeregt. Die Funktion der Osteoklasten wird durch EPO alleine nicht stimuliert. Zusammenfassend stimuliert EPO die Knochenbildung im Mausmodell.

2.5.6 Nebenwirkungen

Unter der Behandlung mit EPO können verschiedene Nebenwirkungen auftreten, die durch die Veränderung der Blutrheologie hervorgerufen werden. So kann man bei einem Viertel der Patientin eine relevante, behandlungsbedürftige arterielle Hypertonie beobachten [83]. Zusätzlich führt der Anstieg des zellulären Anteils des Blutes (Hämatokrit) zur Erhöhung des thrombembolischen Risikos, was zu tiefen

Venenthrombosen, Shuntverstopfungen oder Herzinfarkten führen kann. Daher sollte bei der Behandlung mit EPO eine adäquate Antikoagulation des Patienten erfolgen und zusätzlich der Hämatokritwert regelmäßig laborchemisch kontrolliert werden. Weitere Nebenwirkungen sind Kopfschmerzen, Verwirrtheit, Unruhe, Krampfanfälle und Hautallergien. Aufgrund des Nebenwirkungsprofils sollte die Indikationsstellung zur Anwendung bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit (PAVK), Patienten mit einem Epilepsie- oder Tumorleiden sowie bei Schwangeren und in der Stillzeit streng erfolgen [11,27].

2.6 Zielsetzung

Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob die Behandlung mit EPO die Frakturheilung unter ischämischen Bedingungen im Mausmodell beeinflusst.

2.7 Fragestellung

Die Nullhypothese lautet:

„Die Frakturheilung unter ischämischen Bedingungen wird durch die Gabe von EPO nicht beeinflusst.“

3 Material und Methoden

3.1 Methoden

Es folgt eine Beschreibung der Methoden, welche im Zuge der vorliegenden Arbeit Anwendung gefunden haben.

3.1.1 Studiendesign

Die Tierversuche mit der Versuchsnummer 24/2014 wurden durch das Landesamt für Verbraucherschutz, Abteilung Lebensmittel- und Veterinärwesen (Zentralstelle, Konrad-Zuse-Str.11, 66115 Saarbrücken) genehmigt. Die Durchführung der Versuche erfolgte am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar. Die Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes wurden eingehalten.

Die Untersuchungen erfolgten an insgesamt 45 Tieren. 24 Tiere erhielten täglich intraperitoneal EPO. 21 Tiere erhielten täglich intraperitoneal eine äquivalente Menge Kochsalzlösung (NaCl). Die Frakturheilung wurde nach 2 Wochen (n = 29) und 5 Wochen (n = 16) untersucht. Es wurden radiologische (Röntgen und Micro-CT), biomechanische, histomorphometrische und Western Blot Untersuchungen durchgeführt. Zur Reduktion der Versuchstiere wurden die radiologischen, biomechanischen und histomorphometrischen Analysen jeweils am selben Versuchstier durchgeführt.

	Erythropoietin		Kontrolle	
	2 Wochen	5 Wochen	2 Wochen	5 Wochen
Röntgen	n = 9	n = 10	n = 9	n = 9
Biomechanik	n = 9	n = 10	n = 7	n = 8
Histomorphometrie	n = 9	n = 9	n = 9	n = 5
Micro-CT	n = 9	n = 10	n = 9	n = 9
Western Blot	n = 5	/	n = 5	/

Tab. 1: Studiendesign

3.1.2 Tiermodell

Als Versuchstiere wurden ausgewachsene, 8–36 Wochen alte CD-1 Mäuse mit einem mittleren Gewicht von $34 \text{ g} \pm 0,81$ (EPO-Gruppe 32 g , Kontrollgruppe 35 g) verwendet. Aufzucht und Tierhaltung erfolgten am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes. Die Tiere wurden unter klimatisierten Raumbedingungen (Lufttemperatur: $22\text{--}24 \text{ }^{\circ}\text{C}$, relative Luftfeuchte: 60%) und 12-stündigem Tag-/Nachtrhythmus gehalten. Hierbei wurden maximal 3 Tiere in einem Käfig gehalten. Die Ernährung der Tiere erfolgte durch Standarddiätfutter in Pelletform und Wasser ad libitum.

Die osteosynthetische Versorgung der Femurfraktur erfolgte mit einer intramedullären Zugschraube (MouseScrew™, RISystem AG, Davos, Schweiz). Die Schraube mit einer Länge von $17,2 \text{ mm}$ und einem Durchmesser von $0,5 \text{ mm}$ ist aus medizinischem Stahl gefertigt. Sie besitzt in ihrem proximalen Anteil ein Gewinde der Länge 4 mm mit einem Durchmesser von 5 mm . Im Bereich des Gewindes ist die Schraube auf einer Länge von 1 mm kanüliert, sodass sie über einen intramedullären Führungsdraht eingebracht werden kann. Über den Konus (Durchmesser: $0,8 \text{ mm}$) am distalen Ende der Schraube, welcher sich im Bereich der Femurkondylen verankert, gelingt eine Kompression des Frakturspaltes. Die Schraube wird mit einem Schraubendreher eingebracht und bricht bei einem definierten Drehmoment im Bereich der Sollbruchstelle ab.

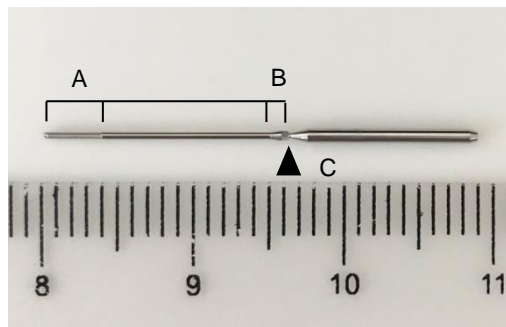


Abb. 1: MouseScrew™ - Gewinde (A), Konus (B), Sollbruchstelle (C); Schraubenlänge: $17,2 \text{ mm}$, Durchmesser: $0,5 \text{ mm}$, Material: medizinischer Stahl

3.1.3 Operationsverfahren

Die Versuchsdurchführung fand am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes statt, unter jeweils gleichen standardisierten Bedingungen.

Die Anästhesie der Versuchstiere erfolgte mittels intraperitonealer Injektion von 15 mg/kg Körpergewicht (KG) Xylazin (Rompun® 2%, Bayer Vital GmbH, Leverkusen,

Deutschland) und 75 mg/kg KG Ketamin (Ursostamin® 100mg, Serumwerke Bernburg, Bernburg, Deutschland). Zum Schutz der Augen wurde Dexpanthenol-Salbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH) auf die Hornhaut appliziert. Die Behaarung des rechten Beines in der Inguinalregion sowie im Bereich des Ober- und Unterschenkels wurde zunächst mittels elektrischer Rasur und anschließend mit einer Enthaarungscreme (elca-med®, ASID BONZ GmbH, Herrenberg, Deutschland) entfernt.

Die Maus wurde anschließend in Rückenlage auf dem Operationstisch gelagert und das rechte Bein in Extensions- und Außenrotationsstellung mittels Fixierpflaster (Leukotape classic®, BSN Medical, Hamburg, Deutschland) auf der Unterlage fixiert. Anschließend erfolgte die gründliche Hautdesinfektion mit Softasept® N (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Dann erfolgte unmittelbar vor dem Hautschnitt regelrecht die Prüfung einer ausreichenden Narkotisierung über die Schmerzreflexe der Versuchstiere. Bei adäquater Narkosetiefe begann die Operation mittels Hautschnitt. Dieser erfolgte nach erneuter sorgfältiger Hautdesinfektion mit Softasept N mit einer Skalpellklinge (Carbon Steel Skalpellklingen #15, Braun Aesculap AG & Co KG, Tuttlingen, Deutschland) auf einer Länge von 1 cm in der Inguinalregion unterhalb des Leistenbandes in horizontaler Richtung unter Schonung des äußerlich sichtbaren Gefäß- Nervenbündels (Abb. 2, Abb. 3), bestehend aus Nervus femoralis, Arteria und Vena femoralis (Abb. 4). Anschließend wurde unter dem Mikroskop (Leica M651, Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland) der Abgang des Ramus superficialis der Arteria femoralis aufgesucht und das Gefäß an dieser Stelle aus dem umgehenden Gewebe frei präpariert. Anschließend erfolgte unter mikroskopischer Sicht die zweifache Ligatur des Gefäßes mittels Seidenfaden der Stärke 0,7 mm (RESORBA, Nürnberg, Deutschland), ohne die umliegenden vaskulären und nervalen Strukturen zu verletzen (Abb. 5). Nach erfolgreicher, suffizienter Ligatur erfolgte nach vorheriger Spülung des Situs mit NaCl-Lösung der Hautverschluss mittels 4-0 Prolene-Faden (Ethicon Inc., Somerville, USA) in Einzelknopftechnik.



Abb. 2: Inguinalregion der Maus, Vergrößerung unter dem Mikroskop.



Abb. 3: Hautschnitt im Bereich der Inguinalregion.

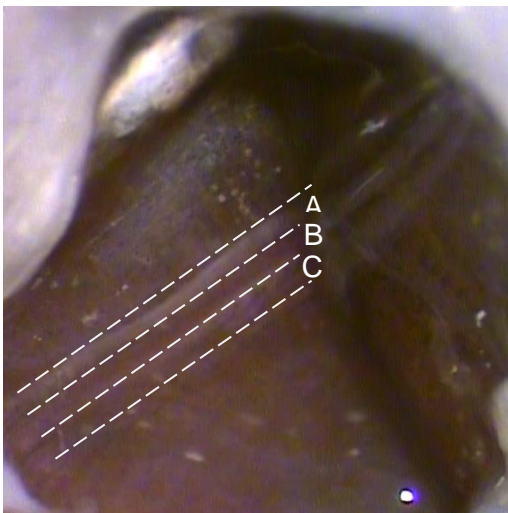


Abb. 4: Verlauf des Nervus femoralis (A), der Arteria (B) und Vena (C) femoralis unterhalb des Leistenbandes.



Abb. 5: Ligatur des Ramus superficialis der Arteria femoralis.

Nachdem das Fixierpflaster gelöst wurde, erfolgte die Fixierung des rechten Beines mittels Daumen, Zeigefinger und Mittelfinger der linken Hand (Abb. 6). Es erfolgten die erneute Hautdesinfektion sowie die Prüfung der Narkosetiefe. Anschließend erfolgte die Inzision der Haut mittels Skalpellklinge medial der Patella am medialen Rand der äußerlich identifizierbaren Patellarsehne in vertikaler Richtung auf einer Länge von 5 mm (Abb. 7) mit folgender Mobilisation der Patellarsehne. Dann erfolgten die Luxation der Patella nach lateral sowie die anschließend forcierte Flexion im Kniegelenk, sodass die Femurkondylen dargestellt werden konnten (Abb. 8). Die Eröffnung des Markraumes erfolgte, sowohl in der koronaren als auch sagittalen Ebene, zentral im Bereich der Fossa intercondylaris mit einer Spritzkanüle der Stärke 24 G (BD Microlance 3, 24 G 1", Nr. 17, Durchmesser: 0,55 x 25 mm, BD

Drogheda, Irland) (Abb. 9). Nun wurde eine 27 G Dental-Anästhesiekanüle (Sterican® Einmalkanüle für die Dental-Anästhesie, O./U.-Kiefer, Leitungsanästhesie, Größe 30/42, G 27 x 1“, Durchmesser: 0,40 x 40 mm, B. Braun) über den Markraum eingeführt und anschließend über den Markraum durch die Gegenkortikalis und Haut vorgeschoben (Abb. 10). Anschließend erfolgte die Insertion des Führungsdrahtes (0,2 mm Wolfram-Draht, Goodfellow Cambridge Limited, Huntingdon, England) in die Kanüle, welcher dann antegrad unter Entfernung der Kanüle nach distal in den Markraum vorgezogen wurde, sodass dieser intramedullär zum Liegen kam und sowohl das proximale als auch das distale Ende hervorschauten (Abb. 11, Abb. 17). Nach erneuter Überprüfung der Narkosetiefe wurde das rechte Femur der Maus in eine 3-Punkt-Biege-Apparatur positioniert und das Femur geschlossen frakturiert (Abb. 12). Die somit generierte Fraktur entsprach, gemäß der AO Klassifikation, dem Typ A2 bis A3 [80]. Eine röntgenologische Kontrolle des rechten Femurs in seitlicher Ebene zwecks Beurteilung der Fraktur sowie der weiterhin gesicherten intramedullären Lage des Führungsdrahtes wurde angefertigt (Abb. 18). Nachfolgend wurde die intramedulläre Zugschraube (MouseScrew™) in den dafür vorgesehen Schraubendreher eingespannt. Die Maus wurde erneut auf die linke Körperseite gedreht. Ring- und Mittelfinger wurden auf dem Rücken der Maus um den Führungsdraht platziert, wobei mittels Daumen und Zeigefinger Femur und Unterschenkel durch Hyperflexion im Kniegelenk gegeneinander gedrückt wurden. Hierdurch wurde eine adäquate Reposition der Fraktur erreicht. In dieser Position erfolgte das Einbringen der Schraube über den Führungsdraht von distal nach proximal unter stetigem, leichten Druck und Rotation im Uhrzeigersinn, zur Verankerung im proximalen Femur (Abb. 13). Zeitgleich wurde der Führungsdraht nach dorsal entfernt. Die Schraube wurde so weit in den Knochen eingebracht, dass die Basis des Konus am distalen Ende der Schraube unterhalb der Kondylenebene ihre endgültige Position erreicht hatte (Abb. 14). Die intramedulläre Lage der Schraube, ihre Verankerung im proximalen Femur sowie die suffiziente Reposition der Fraktur wurden anschließend röntgenologisch in einer seitlichen Röntgenaufnahme des gesamten rechten Femurs dokumentiert (Abb. 19). Anschließend erfolgte die Reposition der Patella unter Extension des Beines im Kniegelenk. Unter wiederholter passiver Extension und Flexion im Kniegelenk wurde die ausreichende Einbringtiefe kontrolliert. Der Streckapparat wurde abschließend zwecks Luxationsschutz mittels einer Einzelknopfnäht vernäht (Prolene 5-0, Ethicon Inc.) (Abb. 15). Nach Spülung des Situs mit NaCl-Lösung erfolgte der Hautverschluss mittels dreier Einzelknopfnähte (Prolene 4-0, Ethicon Inc.) (Abb. 16).



Abb. 6: Fixation des rechten Beines während der OP; Patellarsehne transkutan sichtbar.



Abb. 7: Senkrechter Hautschnitt medial der Patellarsehne.



Abb. 8: Nach Inzision des Bindegewebes medial und Luxation der Patellarsehne nach lateral Sicht auf das Kondylenmassiv des Femurs.



Abb. 9: Interkondyläres Aufbohren der Femurkortikalis und Einführen der Kanüle 24 G in den Markraum.



Abb. 10: Einführen der Kanüle 27 G in den Markraum und Punktion der Rückenhaut.



Abb. 11: Intramedulläre Lage des Führungsdrahtes.



Abb. 12: Erzeugung der Fraktur mittels 3-Punkt-Biege-Vorrichtung.



Abb. 13: Einführen der Kompressionsschraube mit dem Schraubendreher.



Abb. 14: Finale Lage der Kompressionsschraube nach Verankerung.



Abb. 15: Naht der Patellarsehne.



Abb. 16: Hautverschluss mit Einzelknopfnähten.



Abb. 17: Röntgenologische Kontrolle der intramedullären Lage des Führungsdrahtes.



Abb. 18: Röntgenologische Kontrolle der Femurfraktur.



Abb. 19: Röntgenologische Abschlusskontrolle: Regelrechte Lage der Kompressionsschraube bei anatomischer Reposition der Fraktur.

3.1.4 Medikamentenapplikation

Abhängig von der Gruppenzugehörigkeit wurden den Versuchstieren über einen Zeitraum von 2 oder 5 Wochen 100 IE EPO/g KG (Epoetin α) beziehungsweise eine äquivalente Menge an Natriumchlorid-Lösung (NaCl; Isotone Kochsalz-Lösung 0,9 %, B. Braun Melsungen AG) intraperitoneal appliziert.

3.1.5 Tötung der Tiere

Nach 2 oder 5 Wochen erfolgte eine röntgenologische Kontrolle der rechten Femora der Versuchstiere in der seitlichen Ebene. Anschließend wurden die Tiere nach vorheriger Narkotisierung durch Genickbruch getötet und jeweils beide Femora ausgebaut.



Abb. 20: Röntgenologische Kontrolle nach zweiwöchiger Heilungsphase mit sichtbarer Kallusbildung.

3.1.6 Präparation der Knochen

Zur Auswertung wurden beide Femora explantiert. Hierzu wurden die Versuchstiere nach regelrechter vorheriger Tötung auf dem Bauch gelagert. Der Hautschnitt erfolgte beidseits auf Höhe des Tibiaplateaus entlang der Achse des Femurs bis nach proximal auf Höhe des Hüftgelenks. Anschließend wurde die Patellarsehne durchtrennt und die Oberschenkelmuskulatur bis zum Becken abpräpariert. Das Femur wurde sodann im Hüftgelenk exartikuliert und der Knochen von umliegendem Weichteilgewebe befreit. Aus den frakturierten rechten Femora wurde unter Verwendung des entsprechenden Explantationsinstrumentes die Schraube entfernt. Während der Explantation wurden die Femora stetig mit NaCl-Lösung befeuchtet (Isotone Kochsalz-Lösung 0,9 %, B. Braun Melsungen AG) und anschließend in mit NaCl-Lösung befeuchtete Kompressen eingewickelt. Bis zur weiteren Analyse wurden die Knochen in Formalinlösung (4%) konserviert.

Beim Ausbau der Knochen für die Western Blot Analyse wurde bis zur Explantation in gleicher Weise verfahren. Dann wurde das gesamte Kallusgewebe der frakturierten Femora abpräpariert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Analyse kryokonserviert.

3.2 Zielkriterien und Auswertung

3.2.1 Röntgen

Nach 2 und 5 Wochen erfolgte die röntgenologische Kontrolle beider ausgebaute Femora des entsprechenden Versuchstieres anhand eines Röntgenbildes in der anteroposterioren (ap) Ebene (Belichtungszeit: 10 s, Spannung: 26 kV) (MX-20, Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, IL, USA; Faxitron Sr 1.4.1, Faxitron X-ray Corporation). Die Auswertung erfolgte mit dem Goldberg-Score [26]. Anhand des Scores wurde die Knochenheilung bestimmt (Tab. 2).

Score	
0	fehlende knöcherne Überbauung des Fraktuspaltes
1	partielle Überbauung des Fraktuspaltes
2	komplette knöcherne Überbauung des Fraktuspaltes

Tab. 2: Goldberg-Score



Abb. 21: Röntgenbilder der ausgebauten Femora im anteroposterioren Strahlengang: frakturiertes Femur (A) im Vergleich zum gesunden, kontralateralen Femur (B).

3.2.2 Biomechanik

Die biomechanische Auswertung beider Femora erfolgte nach 2 und 5 Wochen. Hierbei wurde die Kallussteifigkeit [N/mm] beider Femora zerstörungsfrei mittels 3-Punkt-Biege-Testung (Mini-Zwick Z 2.5, Zwick GmbH, Ulm, Deutschland) gemessen. Um die Biegesteifigkeit sowohl absolut als auch relativ angeben zu können, wurde die Steifigkeit der unfrakturierten Femora ebenfalls gemessen. Um standardisierte Bedingungen zu gewährleisten, wurden die Femora jeweils mit der dorsalen Seite und den Kondylen nach oben zeigend in der Versuchsvorrichtung positioniert. Der Abstand beider Stempel zueinander betrug stets 6 mm, die Kraftmessung erfolgte kontinuierlich mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/min. Die Biegesteifigkeit der Femora wurde im linearen Anteil des Kraft-Weg-Diagramms bestimmt.

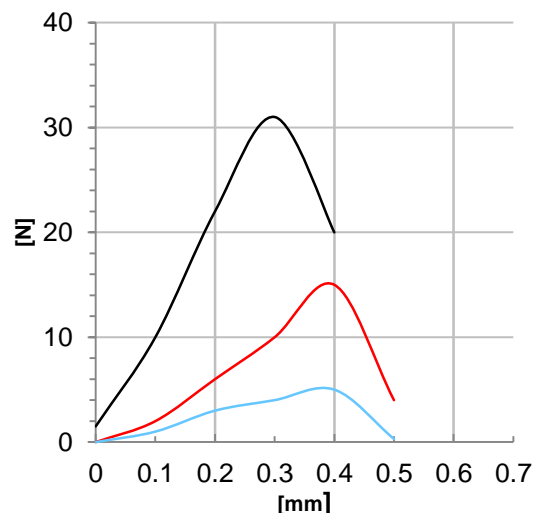


Abb. 22: Positionierung des ausgebauten Femurs in der 3-Punkt-Biege-Einrichtung (A). Kraft-Weg-Diagramm im Vergleich: gesundes, kontralaterales Femur (schwarz), EPO nach zweiwöchiger Frakturheilung (blau) und EPO nach fünfwöchiger Frakturheilung (rot).

3.2.3 Histologie

Im Anschluss an die biomechanischen Untersuchungen wurden die verheilten rechten Femora 12–24 Stunden in Zink-Lösung (ICH Zinc Fixative, BD Biosciences Pharmingen™, San Jose, CA, USA) fixiert, anschließend 2 Wochen in 13%iger EDTA-Lösung bei einer Temperatur von 4 °C entkalkt und dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils 1 Stunde mit 70 %, 80 %, 90 % sowie viermal eine Stunde mit 100 % Alkohol) entwässert. Um das Gewebe paraffingängig zu machen erfolgten anschließend 3 jeweils einstündige Behandlungen der Femora mit Xylol. Die Einbettung in heißes Paraffin erfolgte für insgesamt eine Stunde. Aus den fertigen Paraffinblöcken wurden Schnitte von 5 µm Dicke aus dem Bereich des maximalen Kallusdurchmessers in sagittaler, longitudinaler Schnittführung angefertigt. Die anschließende Färbung erfolgte mittels Safranin O-Technik. Die histologischen Schnitte wurden mit dem Mikroskop (Zeiss Axio Vision 3.1 und Zeiss Axio Cam, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei 1,25-facher Vergrößerung (Olympus BX60 Microscope, Olympus, Tokio, Japan) digitalisiert. Die Auswertung der digitalisierten histologischen Schnitte konnte dann mit einem Bildbearbeitungsprogramms (ImageJ Analysis System, U.S. National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) erfolgen. Hierbei wurden folgende Parameter bestimmt:

- Periostale Gesamtkallusfläche [mm²]
- Knöcherner Anteil innerhalb des periostalen Kallus [mm²]
- Knorpeliger Anteil innerhalb des periostalen Kallus [mm²]
- Bindegewebiger Anteil innerhalb des periostalen Kallus [mm²]

In Anlehnung an die Nomenklatur von Gerstenfeld et al. [24] wurde die Berechnung folgender Zielwerte auf Grundlage der erhobenen Messdaten festgelegt:

Anteil von Knochengewebe an der Gesamtkallusfläche:

$$\frac{\text{Knochenfläche innerhalb der Kallusregion (TOTAr)}}{\text{Gesamtkallusfläche (CAr)}} [\%]$$

- Anteil von Knorpelgewebe an der Gesamtkallusfläche:

$$\frac{\text{Knorpelfläche innerhalb der Kallusregion (CgAr)}}{\text{Gesamtkallusfläche (CAr)}} [\%]$$

- Anteil von Bindegewebe an der Gesamtkallusfläche:

$$\frac{\text{Bindegewebsfläche innerhalb der Kallusregion (FTAr)}}{\text{Gesamtkallusfläche (CAr)}} [\%]$$

3.2.3.1 Safranin O-Färbung

Die Safranin O-Färbetechnik wird vornehmlich zur gezielten Darstellung von Knorpelgewebe verwendet. Knorpelgewebe stellt sich orange bis rot dar. Die Zellkerne werden schwarz eingefärbt. Das Zytoplasma imponiert gräulich-grün. Hierzu werden die deparaffinierten histologischen Schnitte zunächst für 1 Minute mittels Eisenhämatoxylin nach Weigert eingefärbt. Die Eisenhämatoxylinlösung nach Weigert wurde aus 2 Stammlösungen, einer Hämatoxylinlösung und einer Eisenchloridlösung, hergestellt. Für die Hämatoxylinlösung wurde 1 g Hämatoxylin (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA) in 100ml 96%igem Ethanol gelöst und 1 Woche reifen gelassen. Für die Eisenchloridlösung wurden 2,48 g Eisenchlorid-Hexahydrat (VWR International) in 100ml Aqua destillata (Aq. dest.). gelöst und mit 1 ml konzentrierter Salzsäure versetzt. Kurz vor Gebrauch wurden beide Lösungen zu gleichen Teilen gemischt. Nach erfolgter Färbung mit der Eisenhämatoxylinlösung, wurden die Schnitte mit Aqua destillata abgespült und umgehend mittels Salzsäure-Alkohol differenziert. Nach dem Bläuen unter laufendem Wasser für 5 Minuten sowie erneuter Spülung mit Aq. dest. erfolgte die Färbung mittels 0,02 % Fast Green Lösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) für 4 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte mit 1%iger Essigsäure gespült und für 5 weitere Minuten in 0,1%iger Safranin O-Lösung (Merck KGaA) gefärbt. Abschließend erfolgte die Entwässerung mit 90%igem Ethanol sowie die Behandlung mit Xylol zur Entfernung des Paraffins.

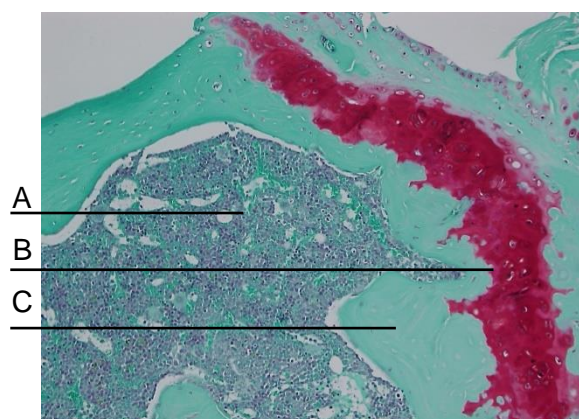


Abb. 23: Sagittaler, longitudinaler histologischer Schnitt im Bereich der Fraktur (Safranin O-Färbung): Bindegewebe (A), Knorpel (B) und Knochen (C).

3.2.4 Micro-CT

Für die Micro-CT Untersuchung wurde das ex-vivo Micro-CT Skyscan 1172 (Fa. Bruker, Billerica, Massachusetts, USA) genutzt. Das System besitzt eine maximale Auflösung von 1–25 μm bei einer maximalen Bildauflösung von 8000 x 8000 Pixeln. Die maximale Größe der zu untersuchenden Proben beträgt 50 mm in Breite und Höhe. Die Röntgenquelle liefert eine Spannung zwischen 20 und 100 Kilovolt bei einer Leistung von 10 Watt. Die anschließende Rekonstruktion erfolgte computergestützt mittels der Software CTAn (Fa. Bruker) unter Verwendung des Feldkamp Algorithmus. Dieser stellt ein Standardverfahren in der industriellen Computertomographie dar und ermöglicht die Reduktion von Artefakten. Nach erfolgter automatisierter Akquisition der Rohdaten mit anschließender Rekonstruktion, erfolgte die manuelle Auswertung. Zunächst wurden hierzu eine Ober- und Untergrenze definiert, welche den gesamten Frakturkallus einschließen. Im Folgenden wurde in den axialen Rekonstruktionen in Abständen von wenigen Schnitten der Kallus, unter Aussparung des Markraumes, händisch nachgefahren. Daraus ergab sich nach computergestützter Interpolierung die Region of Interest (ROI), welche das Volumen des Frakturkallus definiert. Anschließend konnte, unter Verwendung der rekonstruierten Bilddatensätze sowie der jeweils spezifisch generierten ROI, mittels des Analysetools BATman (CTAn, Fa. Bruker) eine komplette Analyse der Daten durchgeführt werden. Analysiert wurden folgende Parameter (Tab. 3).

Parameter Micro-CT
Gesamtvolumen [mm^3] (Tissue Volume, TV)
Knochenvolumen [mm^3] (Bone Volume, BV)
Anteil des Knochenvolumens am Gesamtkallusvolumen [%] (BV/TV)
Trabekeldicke [mm] (Trabecular thickness, TbTh)
Trabekelanzahl [1/mm] (Trabecular number, TbN)
Abstand der Trabekel [mm] (Trabecular separation, TbSp)

Tab. 3: Parameter Micro-CT

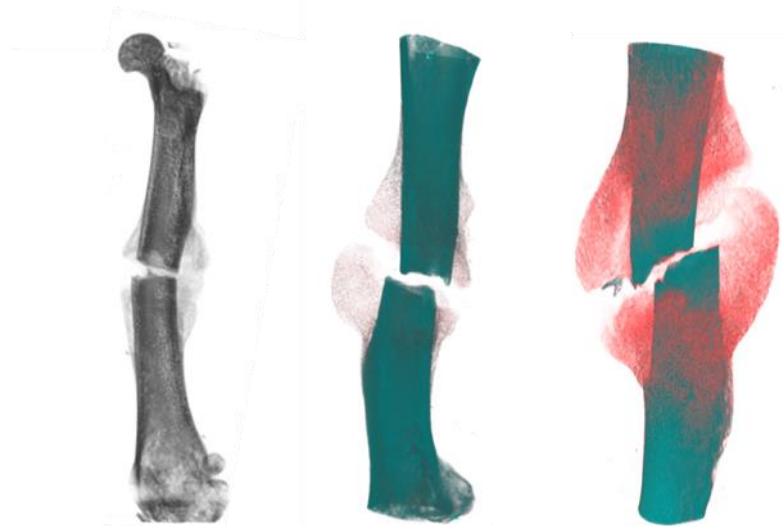


Abb. 24: Schrittweise Auswertung der Micro-CT Untersuchung: Erfassung der Rohdaten (A), Rekonstruktion (B) und Festlegung der ROI mit Bestimmung des Kallusvolumens (C).

3.2.5 Western Blot

Für die Western Blot Analyse wurden insgesamt 10 Versuchstiere, jeweils 5 pro Gruppe, nach zweiwöchiger Frakturheilungsphase untersucht. Von den ausgebauten, jeweils rechten Femora wurde das gesamte Kallusgewebe (knorpeliger und bindegewebiger Anteil) isoliert und unmittelbar im Anschluss mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur endgültigen Analyse bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ kryokonserviert. Anhand dieser Proben wurde die Proteinexpression folgender Marker bestimmt: BMP-2, BMP-4, CD31, CYR61, RANKL, OPG und VEGF. Hierzu wurde das Kallusgewebe in Lysepuffer (10 mM Tris pH 7,5, 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,5 % Triton-X 100, 0,02 % NaN_3 , 0,2 mM PMSF und Protease Inhibitor Cocktail und Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (je 1:100 v/v; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)) homogenisiert. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis mit folgender 30-minütiger Zentrifugation bei $16000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bei der Bestimmung der Proteinkonzentrationen fand die Methode nach Lowry Anwendung. Die Proteinextrakte ($10\text{ }\mu\text{g}$ Protein pro Bahn) wurden diskontinuierlich auf Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel getrennt und auf Polyvinylendifluorid-Membranen übertragen. Dann erfolgte die Blockierung von nicht-spezifischen Bindungsstellen, bevor die Membranen für 4 Stunden bei Raumtemperatur mit folgenden Antikörpern inkubiert wurden: Rabbit Anti-Mouse BMP-2/-4 (1:50, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland), Goat Anti-Mouse CYR61 (1:50, Santa Cruz Biotechnology), Mouse Anti-Mouse PCNA (1:1000, Dako, Hamburg, Deutschland), Rabbit Anti-Mouse RANKL (1:300, Abcam, Cambridge, England). Abschließend wurden die Membranen für 1,5 Stunden mit korrespondierenden Meerrettich-Peroxidase konjugierten Sekundärantikörpern (Ziege-anti-Kaninchen-IgG-

POD, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland; 1:1500, Ziege-anti-Maus-IgG-POD, Dako; 1:1000, Kaninchen-anti-Ziege-IgG-POD, Dako) inkubiert. Mittels Luminol-enhanced Chemiluminescence (ECL Western Blotting Analysis System, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) wurde die Proteinexpression visualisiert. Die Analyse der Signale erfolgte mit einem ECL ChemoCam Imager (Chemostar+ LabImage 1D Software, Jutas Science Imaging Instruments, Göttingen, Deutschland). Zur Korrektur ungleicher Beladung wurden die Daten auf das jeweilige β -Actin-Signal (1:5000, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) normalisiert. Auf eine Analyse der Proteinexpression wurde nach fünfwöchiger Frakturheilung verzichtet, da zu diesem Zeitpunkt nach Ablauf der Remodelingprozesse im Rahmen der Frakturheilung nur noch sehr wenig Kallusgewebe vorhanden war.

Protein	Funktion
BMP-2	Knochenformationsmarker
BMP-4	Knochenformationsmarker
CD31	Marker der Angiogenese/ Gefäßdarstellung
CYR61	Marker der Knochen- und Knorpelbildung sowie Angiogenese
OPG	Inhibition der Osteoklastogenese
RANKL	Stimulation der Osteoklastogenese
VEGF	Stimulation der Angiogenese

Tab. 4: Übersicht der Proteine der Western Blot Analyse

3.3 Statistik

Die in der vorliegenden Arbeit angegebenen statistischen Daten wurden als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM) angegeben. In der statistischen Analyse wurde, nach initialer Prüfung der Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test und Varianzgleichheit mittels F-Test, der Gruppenvergleich mit dem Student's t-Test durchgeführt. Bei nicht vorliegender Normalverteilung wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet. Die Statistik und die Graphen wurden mit der Software RStudio (R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich) erstellt. Signifikanten Unterschieden liegt ein p-Wert $< 0,05$ zugrunde.

4 Ergebnisse

4.1 Röntgen

Die röntgenologische Auswertung 2 Wochen postoperativ zeigte, dass der Frakturspalt in der Kontrollgruppe weniger knöchern überbaut war ($0,5 \pm 0,2$) als in der Erythropoietingruppe ($1 \pm 0,0$). Die Unterschiede waren signifikant ($p < 0,05$).

5 Wochen postoperativ zeigten die Knochen der Kontrollgruppe immer noch eine partielle Überbauung ($1,00 \pm 0,15$). In der Erythropoietingruppe waren die Knochen fast alle vollständig durchbaut ($1,73 \pm 0,14$). Es bestand ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) (Abb. 25).

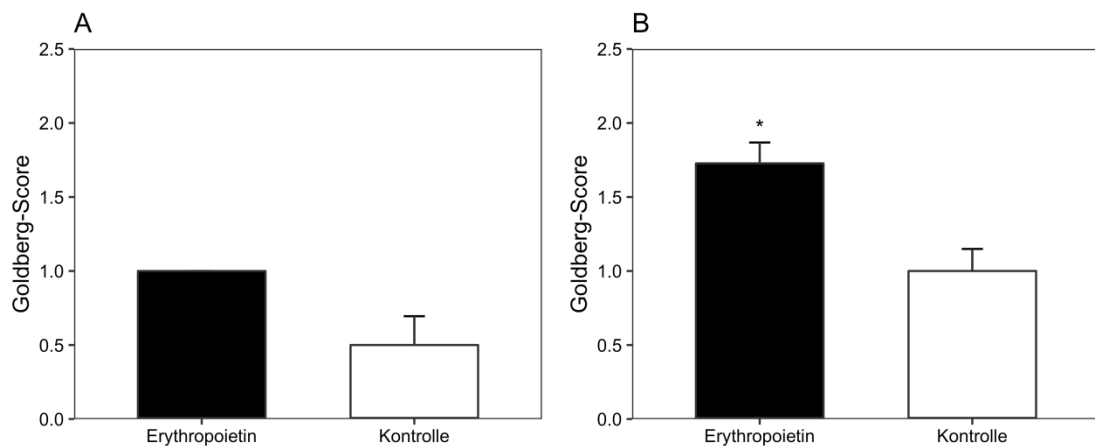


Abb. 25: Ergebnisse der röntgenologischen Auswertung mit dem Goldberg-Score: Ausbleibende knöchernen Überbauung (0 Punkte), partielle Überbauung (1 Punkt), knöchernen Überbauung (2 Punkte). 2 Wochen postoperativ (A), 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM. (* $p < 0,05$).

4.2 Biomechanik

Die Biegesteifigkeit wurde mittels 3-Punkt-Biegung bestimmt. Die Ergebnisse sind als Absolutwerte [N/mm] sowie in Prozent [%] zum gesunden kontralateralen Knochen dargestellt, um individuelle Unterschiede der Knochen zwischen den Versuchstieren zu berücksichtigen.

Die biomechanische Auswertung der frakturierten Knochen 2 Wochen postoperativ zeigte nach Behandlung mit Erythropoietin sowohl gemessen in Absolutwerten als auch in Prozent zum kontralateralen Knochen keine signifikant höhere Biegesteifigkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Erythropoietingruppe wurde ein MW von $4,77 \pm 1,18$ N/mm gemessen. In der Kontrollgruppe wurde eine niedrigere Biegesteifigkeit ermittelt ($4,3 \pm 1,14$ N/mm, $p > 0,05$). Die relative

Biegesteifigkeit in der Erythropoietingruppe betrug $5,79 \pm 1,5$ %. Im Vergleich dazu konnte in der Kontrollgruppe eine relative Biegesteifigkeit von $3,68 \pm 0,95$ % ermittelt werden ($p > 0,05$) (Abb. 26).

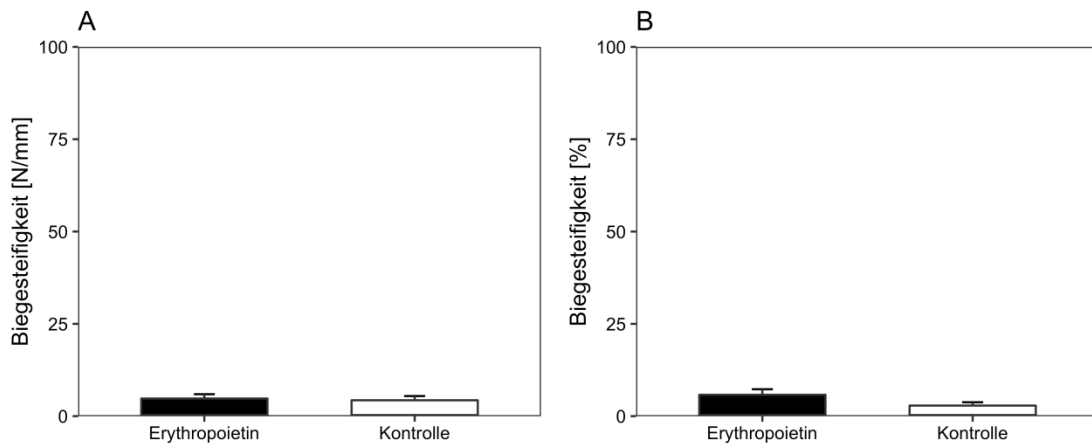


Abb. 26: Ergebnisse der biomechanischen Auswertung. Absolute Biegesteifigkeit (A) und relative Biegesteifigkeit (B) 2 Wochen postoperativ in der Erythropoietingruppe und der Kontrollgruppe. MW \pm SEM.

In der späten Phase der Frakturheilung (5 Wochen postoperativ) zeigte sich jedoch eine signifikant höhere absolute Biegesteifigkeit nach Erythropoietingabe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Durchschnitt wurde in der Erythropoietingruppe eine absolute Biegesteifigkeit von $80,52 \pm 10,71$ N/mm erreicht. In der Kontrollgruppe wurden durchschnittliche Werte von $43,63 \pm 9,46$ N/mm ermittelt ($p < 0,05$). Beim Vergleich der relativen Biegesteifigkeit bestätigte sich der oben genannte signifikante Unterschied. Die mit Erythropoietin behandelten Tiere wiesen eine signifikant erhöhte relative Biegesteifigkeit auf ($76,33 \pm 12,24$ % vs. $40,6 \pm 10,8$ %, $p < 0,05$) (Abb. 27).

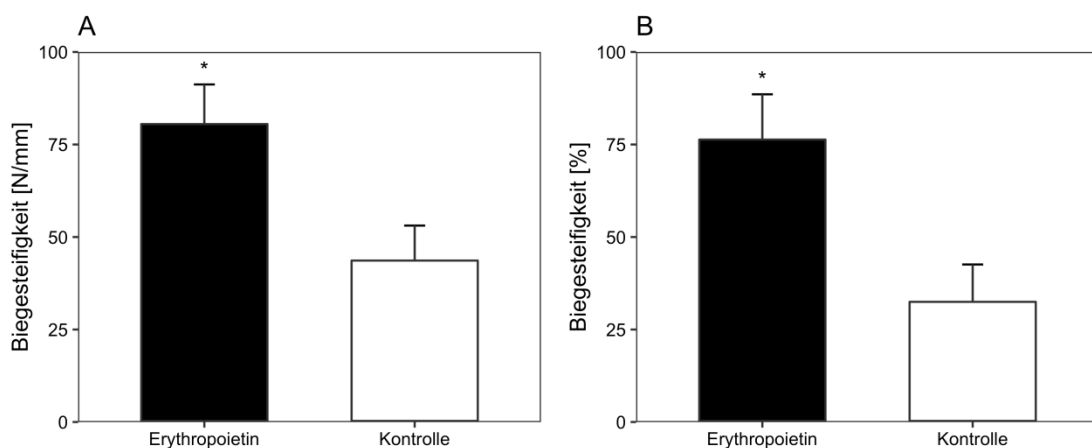


Abb. 27: Ergebnisse der biomechanischen Auswertung. Absolute Biegesteifigkeit (A) und relative Biegesteifigkeit (B) nach 5 Wochen in der Erythropoietingruppe und der Kontrollgruppe. MW \pm SEM. (* $p < 0,05$).

Die absolute Biegesteifigkeit des nicht frakturierten Knochens 2 Wochen postoperativ war nach Erythropoietin-Behandlung ($92,99 \pm 8,88$ N/mm vs. $128,40 \pm 11,87$ N/mm) signifikant geringer als die der nicht frakturierten Knochen der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Nach 5 Wochen ($112,15 \pm 10,74$ N/mm vs. $122,37 \pm 11,37$ N/mm) bestand hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p > 0,05$) (Abb. 28).

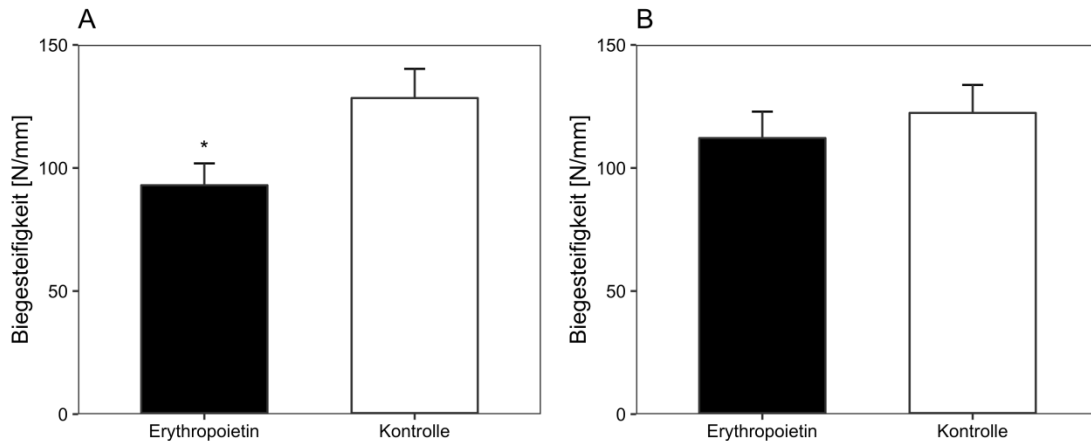


Abb. 28: Ergebnisse der biomechanischen Auswertung. Absolute Biegesteifigkeit der unfrakturierten Knochen 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM. (* $p < 0,05$)

Erythropoietin hat unter ischämischen Bedingungen in der frühen Phase der Frakturheilung einen signifikanten Einfluss auf den Knochenstoffwechsel der gesunden Knochen.

4.3 Histomorphometrie

Die histomorphometrische Analyse des Frakturkallus wurde am sagittalen, longitudinalen Schnittpräparat im Bereich des maximalen Kallusdurchmessers durchgeführt.

Die Analyse der Gewebezusammensetzung zeigte sowohl 2 Wochen postoperativ ($51,43 \pm 5,09$ % vs. $27,77 \pm 7,07$ %, $p < 0,05$) (Abb. 29 A) als auch 5 Wochen postoperativ ($74,72 \pm 4,82$ % vs. $41,28 \pm 6,13$ %, $p < 0,05$) (Abb. 29 B) einen signifikant höheren Knochenanteil in der Erythropoietin-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

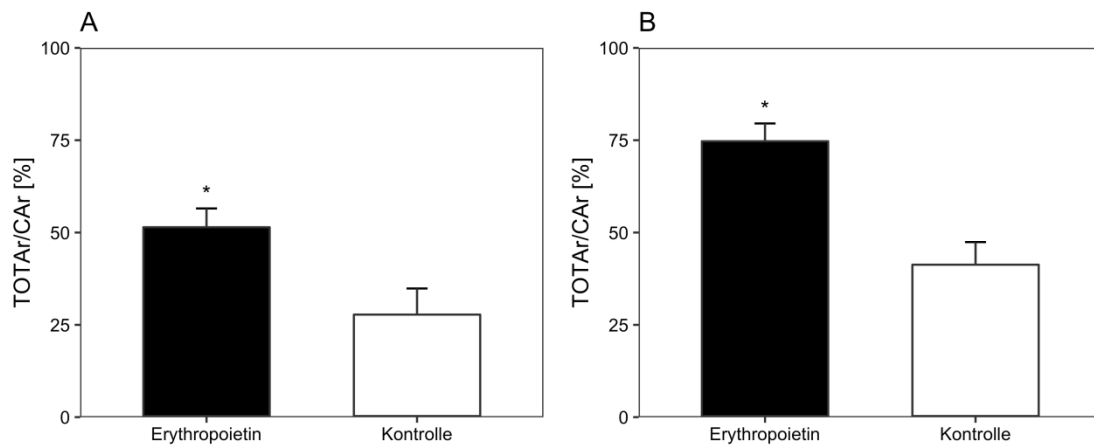


Abb. 29: Ergebnisse der histologischen Auswertung. Prozentualer Anteil des Knochengewebes am Gesamtkallusgewebe 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM. (*p < 0,05).

Der Anteil an Bindegewebe war hingegen in der Erythropoietingruppe sowohl nach 2 Wochen ($14,54 \pm 4,43$ % vs. $46,28 \pm 11,58$ %, $p < 0,05$) (Abb. 30 A) als auch nach 5 Wochen ($13,96 \pm 3,0$ % vs. $49,99 \pm 4,67$ %, $p < 0,05$) (Abb. 30 B) signifikant geringer.

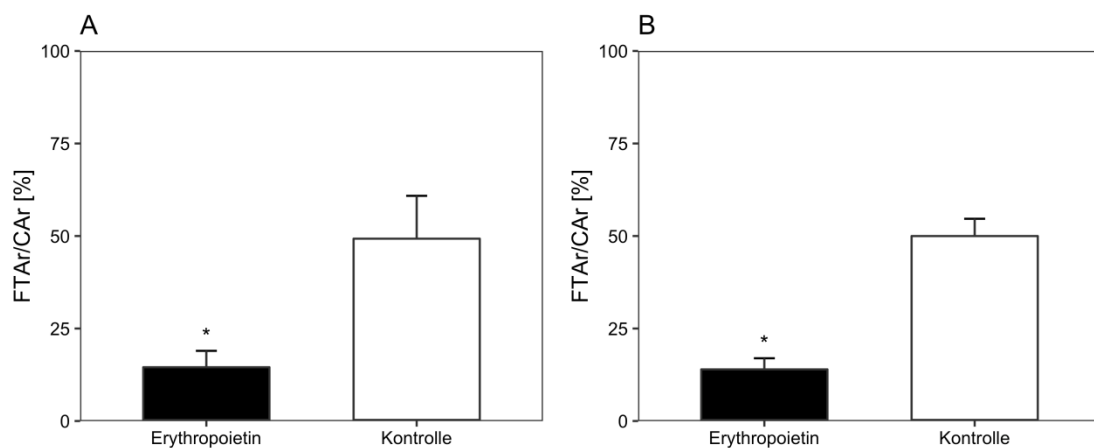


Abb. 30: Ergebnisse der histologischen Auswertung. Prozentualer Anteil des Bindegewebes am Gesamtkallusgewebe 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM. (*p < 0,05).

Beim Vergleich des Knorpelanteils am Gesamtkallus zeigte sich bei beiden Gruppen sowohl 2 Wochen postoperativ ($22,47 \pm 3,39$ % vs. $20,16 \pm 7,89$ %, $p > 0,05$) (Abb. 31 A) als auch 5 Wochen postoperativ ($1,33 \pm 0,37$ % vs. $5,75 \pm 3,6$ %, $p > 0,05$) (Abb. 31 B) kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$).

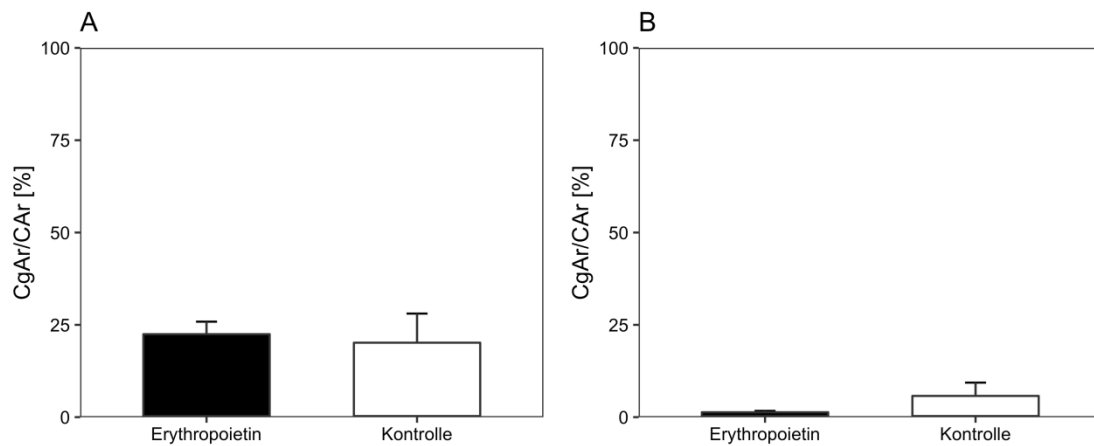


Abb. 31: Ergebnisse der histologischen Auswertung. Prozentualer Anteil des Knorpelgewebes am Gesamtkallusgewebe 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM.

4.4 Micro-CT

Sowohl 2 Wochen als auch 5 Wochen postoperativ wurden die Femora mit der Micro-Computertomographie untersucht.

2 Wochen postoperativ war das Kallusvolumen bei den Tieren, die mit EPO behandelt wurden, signifikant größer ($23,45 \pm 2,12 \text{ mm}^3$ vs. $14,28 \pm 3,39 \text{ mm}^3$, $p < 0,05$) (Abb. 32 A). Nach Abschluss des Remodelingprozesses war das Kallusvolumen signifikant geringer im Vergleich zur Kontrolle ($6,68 \pm 1,15 \text{ mm}^3$ vs. $12,29 \pm 1,65 \text{ mm}^3$, $p < 0,05$) (Abb. 32 B).

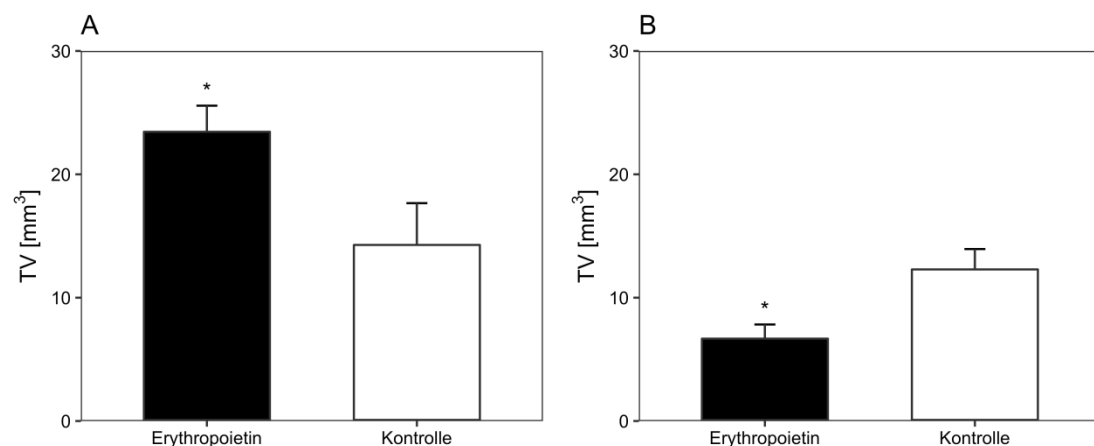


Abb. 32: Ergebnisse der Micro-CT Auswertung. Absolutes Kallusvolumen 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM. (* $p < 0,05$).

Das absolute Knochenvolumen im Kallus der Knochen war 2 Wochen postoperativ in der Erythropoietingruppe signifikant größer im Vergleich zur Kontrolle ($3,2 \pm 0,42 \text{ mm}^3$

vs. $1,58 \pm 0,28 \text{ mm}^3$, $p < 0,05$) (Abb. 33 A). In der späten Phase der Frakturheilung war das Knochenvolumen der Erythropoietingruppe allerdings geringer im Vergleich zur Kontrolle ($2,85 \pm 0,39 \text{ mm}^3$ vs. $6,26 \pm 1,33 \text{ mm}^3$, $p < 0,05$) (Abb. 33 B).

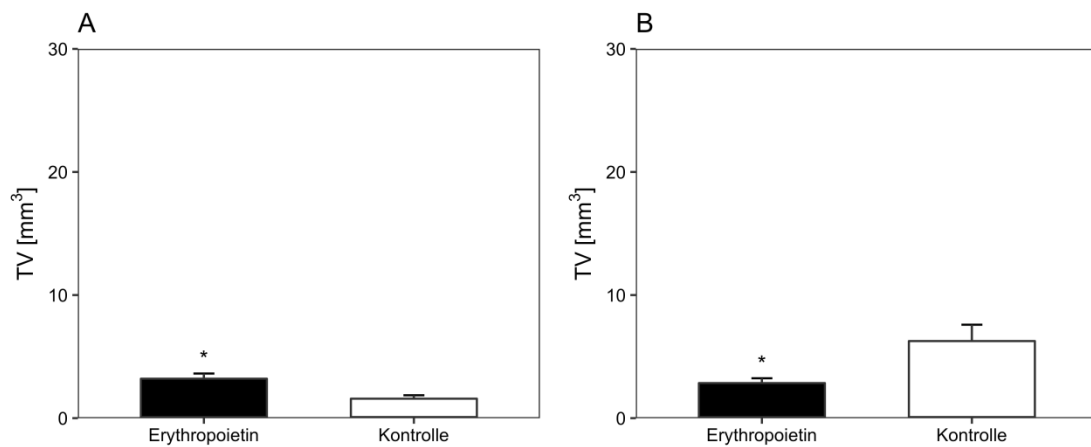


Abb. 33: Ergebnisse der Micro-CT Auswertung. Absolutes Knochenvolumen innerhalb des absoluten Kallusvolumens 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM. (* $p < 0,05$).

Der prozentuale Anteil von Knochengewebe am Gesamtkallusgewebe war bei beiden Gruppen sowohl 2 Wochen postoperativ ($13,99 \pm 1,79 \%$ vs. $15,80 \pm 4,11 \%$, $p > 0,05$) (Abb. 34 A) als auch 5 Wochen postoperativ ($42,51 \pm 5,85 \%$ vs. $50,19 \pm 6,22 \%$, $p > 0,05$) (Abb. 34 B) vergleichbar.

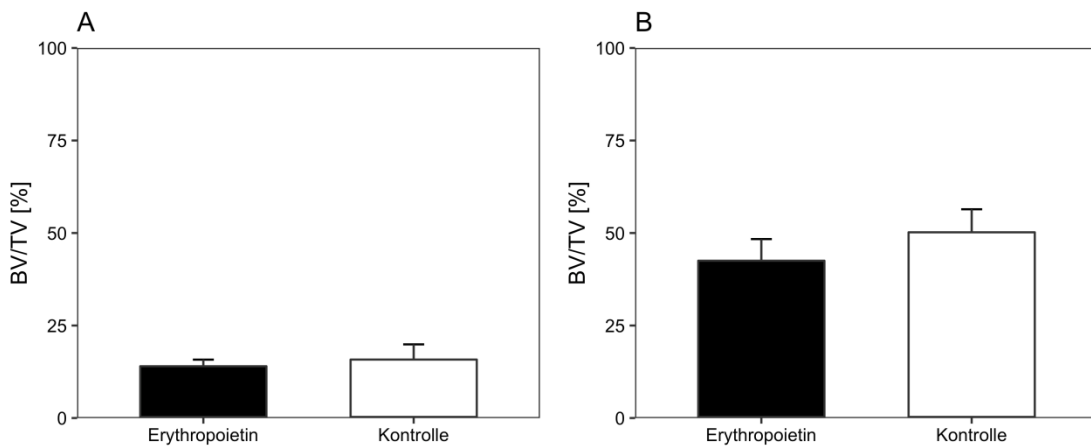


Abb. 34: Ergebnisse der Micro-CT Auswertung. Relativer Anteil des Knochenvolumens am absoluten Kallusvolumen 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM.

Die Anzahl der Trabekel im Kallus beider Gruppen unterschied sich sowohl 2 Wochen postoperativ ($2,90 \pm 0,31 \text{ mm}^{-1}$ vs. $2,88 \pm 0,73 \text{ 1/mm}^{-1}$, $p > 0,05$) (Abb. 35 A) als auch 5 Wochen postoperativ ($4,17 \pm 0,26 \text{ mm}^{-1}$ vs. $4,51 \pm 0,42 \text{ mm}^{-1}$, $p > 0,05$) (Abb. 35 B) nicht signifikant ($p > 0,05$).

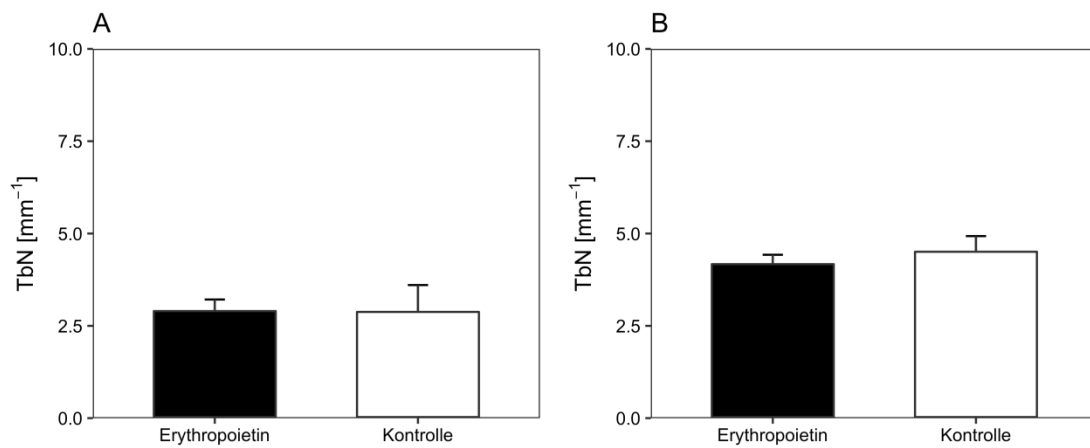


Abb. 35: Ergebnisse der Micro-CT Auswertung. Trabecular Number (Trabekel pro mm) innerhalb des absoluten Kallusvolumens 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM.

Die Trabekeldicke zeigte ebenfalls beim Vergleich beider Gruppen sowohl 2 Wochen postoperativ ($0,05 \pm 0,00$ mm vs. $0,05 \pm 0,00$ mm, $p > 0,05$) (Abb. 36 A) als auch 5 Wochen postoperativ ($0,11 \pm 0,01$ mm vs. $0,11 \pm 0,01$ mm, $p > 0,05$) (Abb. 36 B) keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$).

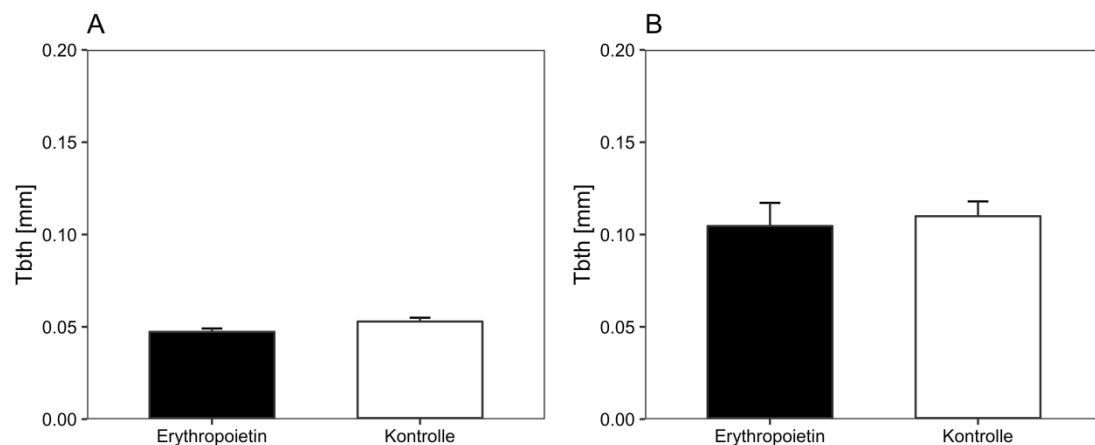


Abb. 36: Ergebnisse der Micro-CT Auswertung. Trabecular thickness innerhalb des absoluten Kallusvolumens 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM.

Der Abstand der Trabekel zueinander war bei beiden Gruppen vergleichbar. Sowohl 2 Wochen postoperativ ($0,37 \pm 0,03$ mm vs. $0,35 \pm 0,03$ mm, $p > 0,05$) (Abb. 37 A) als auch 5 Wochen postoperativ ($0,21 \pm 0,03$ mm vs. $0,19 \pm 0,03$ mm, $p > 0,05$) (Abb. 37 B) bestand kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$).

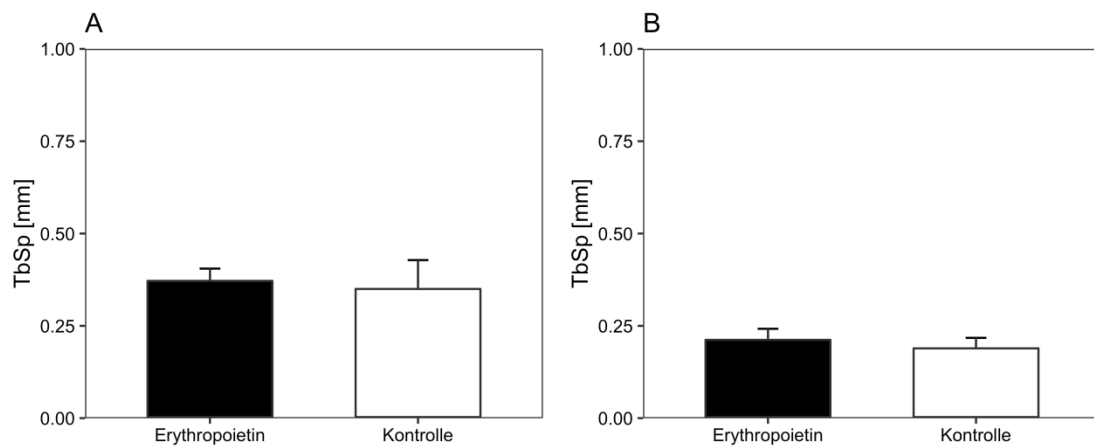


Abb. 37: Ergebnisse der Micro-CT Auswertung. Trabecular separation innerhalb des absoluten Kallusvolumens 2 Wochen postoperativ (A) und 5 Wochen postoperativ (B). MW \pm SEM.

4.5 Western Blot

2 Wochen postoperativ erfolgte die Analyse der Proteinexpression im Kallusgewebe mittels Western Blot.

Die Expression von BMP-2 war im Kallus der mit EPO behandelten Tiere höher, jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant ($1,8 \cdot 10^5 \pm 2,7 \cdot 10^4$ Target-Intensitätspixel (TP)*Korrekturfaktor (KF) vs. $7,7 \cdot 10^4 \pm 3,7 \cdot 10^4$ TP*KF, $p > 0,05$) (Abb. 38). Die Expression von BMP-4 war in beiden Gruppen nahezu identisch ($2,4 \cdot 10^4 \pm 5,7 \cdot 10^3$ TP*KF vs. $2,3 \cdot 10^4 \pm 9,3 \cdot 10^3$ TP*KF, $p > 0,05$) (Abb. 39).

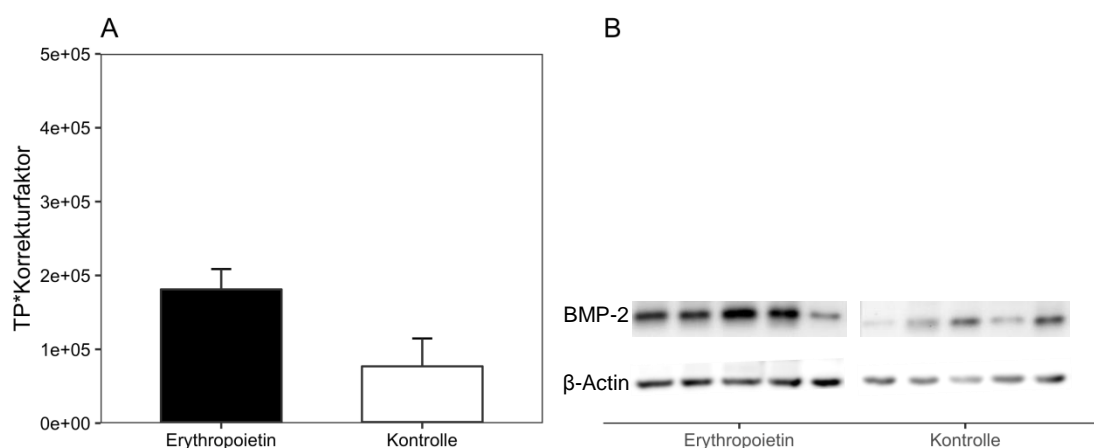


Abb. 38 : Ergebnisse der Western Blot Auswertung. Expression von BMP-2 (Bone morphogenetic protein 2) im Kallus 2 Wochen postoperativ. MW \pm SEM.

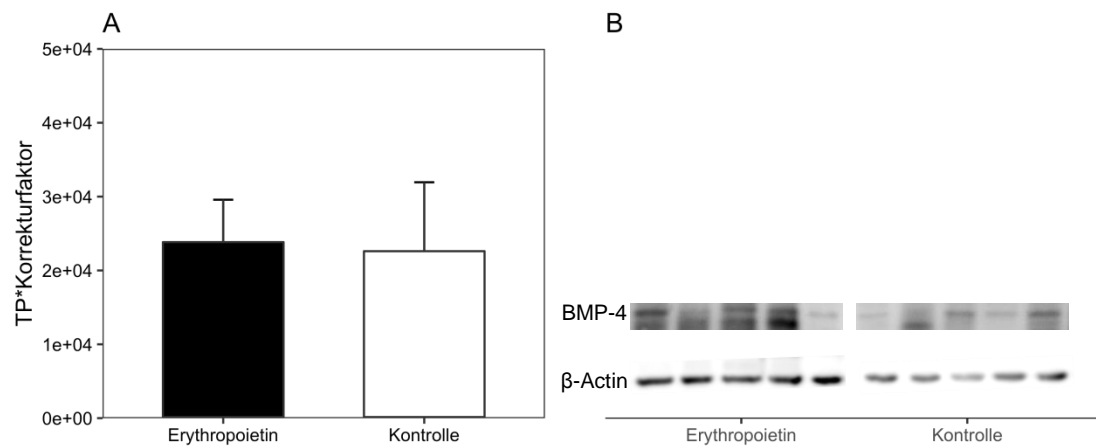


Abb. 39: Ergebnisse der Western Blot Auswertung. Expression von BMP-4 (Bone morphogenetic protein 4) im Kallus 2 Wochen postoperativ. MW ± SEM.

Die Expression von CD31 war in der Gruppe der mit EPO behandelten Tiere höher als in der Kontrollgruppe ($2,3 \cdot 10^5 \pm 2,2 \cdot 10^4$ TP*KF vs. $1,8 \cdot 10^5 \pm 3,3 \cdot 10^4$ TP*KF) (Abb. 40), der Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$).

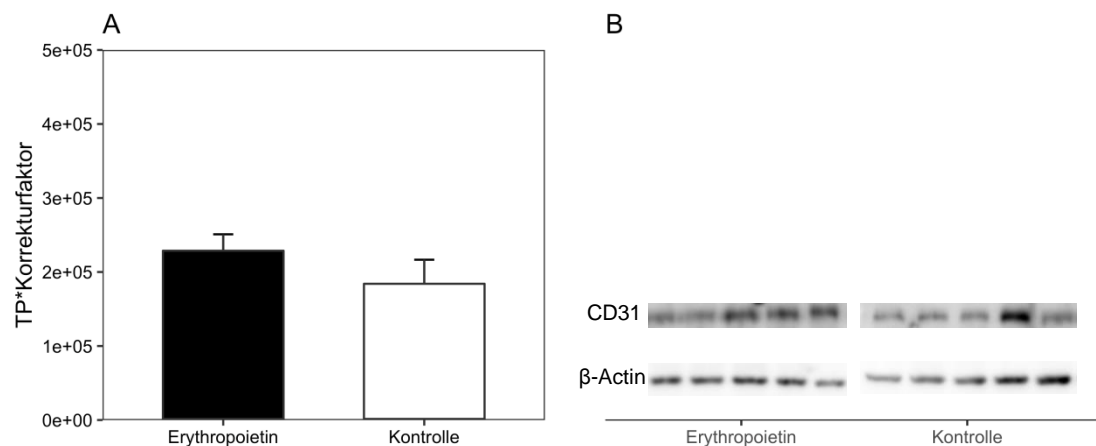


Abb. 40: Ergebnisse der Western Blot Auswertung. Expression von CD31 (Cluster of differentiation 31) im Kallus der Femora 2 Wochen postoperativ. MW ± SEM.

Die Expression von CYR61 war nach Behandlung mit Erythropoietin verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant höher ($3,7 \cdot 10^4 \pm 2,4 \cdot 10^3$ TP*KF vs. $1,9 \cdot 10^4 \pm 1,9 \cdot 10^3$ TP*KF, $p < 0,05$) (Abb. 41).

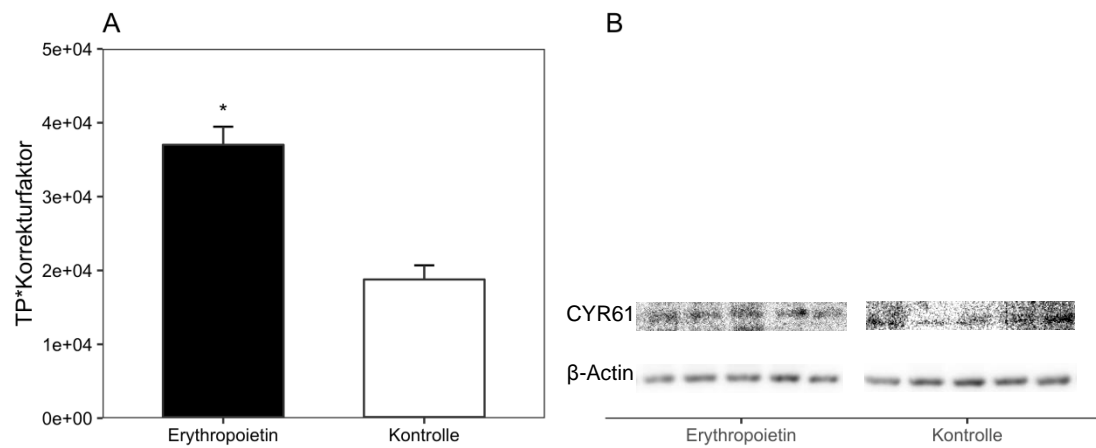


Abb. 41: Ergebnisse der Western Blot Auswertung. Expression von CYR61 (Cysteine-rich angiogenic inducer 61) im Kallus der Femora 2 Wochen postoperativ. MW ± SEM. (*p < 0,05).

VEGF wurde in der Erythropoietingruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich mehr exprimiert ($2,6 \times 10^5 \pm 8,3 \times 10^4$ TP*KF vs. $8,6 \times 10^4 \pm 3,7 \times 10^4$ TP*KF) (Abb. 42).

Allerdings waren die Unterschiede nicht signifikant (p > 0,05).

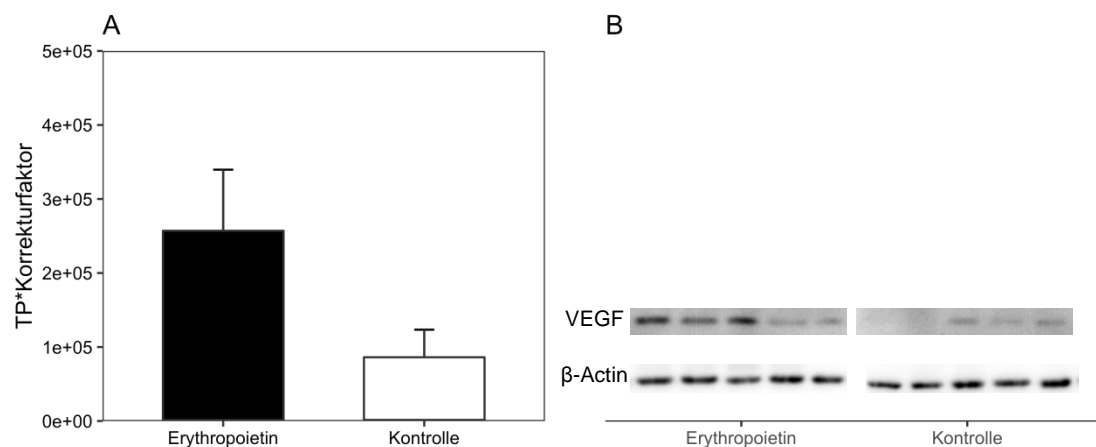


Abb. 42: Ergebnisse der Western Blot Auswertung. Expression von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) im Kallus der Femora 2 Wochen postoperativ. MW ± SEM.

Des Weiteren beeinflusst die Behandlung mit Erythropoietin das OPG/RANKL System. Sowohl die Expression von OPG ($3,8 \cdot 10^4 \pm 3,7 \cdot 10^3$ TP*KF vs. $2,5 \cdot 10^4 \pm 1,6 \cdot 10^3$ TP*KF, $p < 0,05$) (Abb. 43), als auch die Expression RANKL ($3,2 \cdot 10^5 \pm 4,7 \cdot 10^4$ TP*KF vs. $1,2 \cdot 10^5 \pm 3,4 \cdot 10^4$ TP*KF, $p < 0,05$) (Abb. 44) waren in der Erythropoietingruppe signifikant höher.

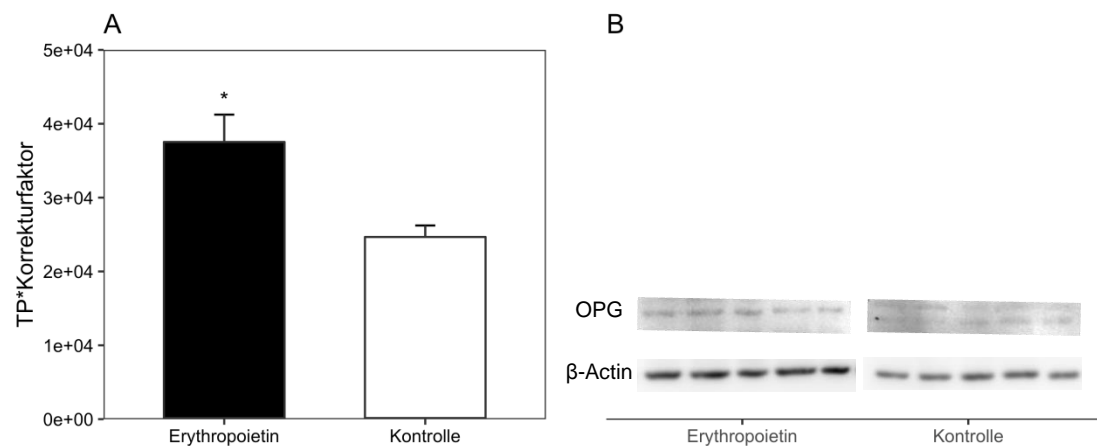


Abb. 43: Ergebnisse der Western Blot Auswertung. Expression von OPG (Osteoprotegerin) im Kallus der Femora 2 Wochen postoperativ. MW ± SEM. (* $p < 0,05$).

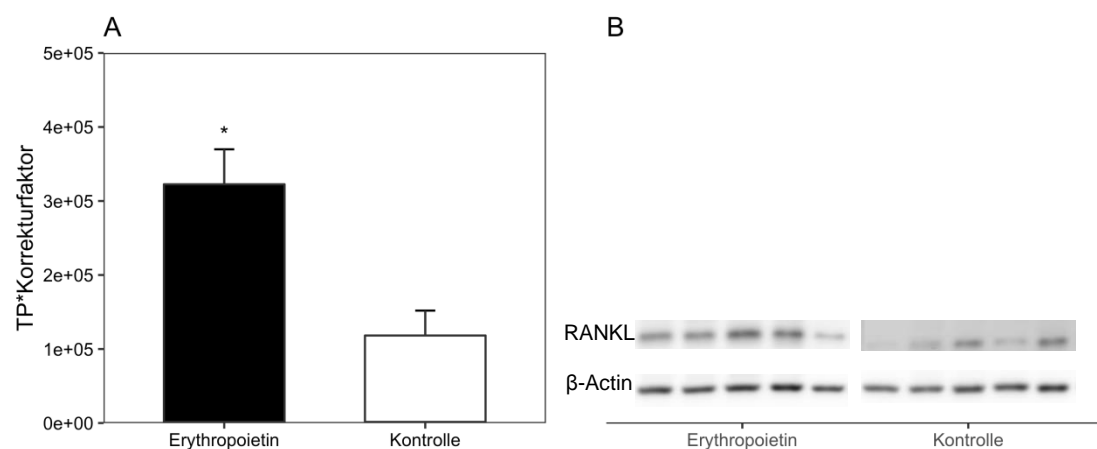


Abb. 44: Ergebnisse der Western Blot Auswertung. Expression von RANKL (Receptor Activator of NF-κB Ligand) im Kallus der Femora 2 Wochen postoperativ. MW ± SEM. (* $p < 0,05$).

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

Die Untersuchung der Knochenheilung ist bereits seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung. Zwar konnten in den letzten Jahre zunehmend computergestützte Simulationsmodelle zur Beurteilung der Knochenheilung entwickelt werden, jedoch ist es aufgrund der Komplexität des Knochenheilungsprozesses und den daran beteiligten biologischen Prozessen nach wie vor nicht möglich, die Rolle von Wachstumsfaktoren in Bezug auf zelluläre Abläufe während des Heilungsprozesses zu untersuchen [24,25,31]. Darüber hinaus gibt es bis dato kein Modell, welches alle Phasen der Frakturheilung zu simulieren vermag. Insbesondere die primäre, inflammatorische Phase der Knochenheilung ist auf Grund der hoch komplexen, proteinbiochemischen Prozesse nicht in silico reproduzierbar [25]. Daraus ergibt sich, dass trotz großer technologischer Fortschritte Tiermodelle zur Untersuchung der Knochenheilung unverzichtbar sind.

Die Untersuchung der Frakturheilung am Großtiermodell bietet gegenüber Kleintiermodellen den Vorteil, dass eine größere anatomische Vergleichbarkeit zum menschlichen Knochen besteht und technische Schwierigkeiten bei der operativen Handhabung und den Analysemethoden damit geringer sind. Andererseits bieten Kleintiermodelle wie die Maus den Vorteil, dass durch das vollständig entschlüsselte Genom eine größere Anzahl transgener Stämme sowie spezifischer Antikörper existieren [41]. Zudem sind Mäuse als Kleintiere in der Haltung günstig und erlauben dadurch Studien mit einer größeren Gruppengröße. Darüber hinaus verläuft die murine Knochenheilung mit einer durchschnittlichen Heilungsdauer von 3 Wochen [76] deutlich schneller als im Großtiermodell. Außerdem ähnelt der Knochenstoffwechsel der Maus dem des Menschen und erlaubt dadurch eine gewisse Vergleichbarkeit [8,41]. Weiterhin hat das Mausmodell bereits vielfach in Studien zu diesem Thema Anwendung gefunden und auch unsere Arbeitsgruppe hat mehrere Mausmodelle zur Analyse der Frakturheilung entwickelt [8,23,42,47,76], sodass die Fortführung der Untersuchung am Mausmodell auch eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen Studien ermöglicht. Vor diesem Hintergrund entschieden wir uns in der vorliegenden Arbeit für die Verwendung von ausgewachsenen CD-1 Mäusen als Versuchstiere.

In verschiedenen Übersichtsarbeiten [41,76] wurden die verfügbaren Frakturmodelle der Maus diskutiert. Die Tibia kann aufgrund ihres geringen Weichteilmantels gut als geschlossenes Frakturmodell verwendet werden. Durch die von Bonnarens und

Einhorn [9] beschriebene Methode kann eine standardisierte, gut reproduzierbare Querfraktur erzeugt werden. Die Fraktur wird zusätzlich durch die parallel zur Tibia verlaufende Fibula stabilisiert. Es ist darauf zu achten, dass es zu einer zusätzlichen Frakturierung der Fibula kommen kann, sodass im Rahmen der Kallusbildung Synostosen entstehen können, die die Frakturheilung biomechanisch beeinflussen. Zur Untersuchung des Weichteilgewebes bietet das Femur gegenüber der Tibia einen entscheidenden Vorteil, da aufgrund des ausgeprägten Muskelmantels auch die molekularen Prozesse des Weichteilgewebes im Rahmen der Frakturheilung untersucht werden können. Während offene Frakturmodelle einen lateralen Zugang für die Osteotomie benötigen [41], erlaubt das in dieser Studie angewandte Modell ein minimalinvasives Einbringen des Implantates. Lu et al. konnten 2007 [66] in einem Mausmodell zeigen, dass eine Ischämie zu verzögerter Frakturheilung führt. Zur Induktion der Ischämie haben die Autoren der Studie auf eine bereits durch Tang et al. [104] beschriebene Methode zurückgegriffen, bei der die A. femoralis auf der Strecke knapp unterhalb des Leistenbandes bis zur poplitealen Bifurkation ligiert und anschließend entfernt wurde. Lu et al. [66] beschreiben, dass es im Rahmen dieser Technik in ihrer Studie zu Komplikationen wie postoperativem Tod sowie Nekrosen der unteren Extremitäten, Füße, Fußzehen und Wundheilungsstörungen kam. Daher untersuchten wir intern in einer Vorstudie alternative Möglichkeiten zur Erzeugung einer Ischämie. Hierzu untersuchten wir 2 verschiedene Techniken. Bei der „schweren“ Ischämie wurde, wie in der Studie von Tang et al. [104] beschrieben, die Arteria femoralis knapp unterhalb des Ligamentum inguinale zunächst ligiert und anschließend reseziert. Hingegen wurde bei Erzeugung einer „milden“ Ischämie der Abgang des Ramus superficialis der Arteria femoralis aufgesucht und anschließend ligiert. Bei der schweren Ischämie fielen postoperativ gehäuft Kontrakturen, Wundheilungsstörungen sowie die Ausbildung von Abszessen auf. Zudem zeigten die Mäuse auch im weiteren Heilungsverlauf ein unphysiologisches Gangbild. Auf Grundlage dieser Beobachtungen und den zu erwartenden Komplikationen hinsichtlich Durchführbarkeit der Studie (z. B. erhöhte Anzahl benötigter Versuchstiere), entschieden wir uns für die Ligatur des Ramus superficialis der Arteria femoralis. Mit diesem Modell kann der Effekt angiogener Faktoren wie z. B. EPO auf die Ischämie-bedingt gestörte Frakturheilung untersucht werden. Zusammengefasst kann das gewählte Tiermodell als reproduzierbar bezeichnet werden und war für die Fragestellung geeignet.

Als Wirkstoff wurde das Präparat Epoetin α in einer Dosierung von 500 IE pro kg KG gewählt. Diese Dosis wurde in Anlehnung an Vorarbeiten zur Wirkung von EPO auf die Frakturheilung gewählt [22,45,47]. Garcia et al. [22] haben die gleiche Dosis

gewählt, welche als Niedrigdosis-Therapie gilt. Erwähnenswert ist die Tatsache, dass der Wirkungseffekt von EPO auf die Wundheilung dosisabhängig ist [100]. Eine Hochdosistherapie jedoch in Form einer mehrmaligen Applikation von 5.000 IE/kg KG hat zu einer Beeinträchtigung des Heilungsprozesses geführt. Dies konnte anhand der geringen Ausreifung eines mikrovaskulären Gefäßnetzes belegt werden. Geringere Dosen konnten bessere Ergebnisse bei der Untersuchung der Wundheilung erzielen. Letztlich konnte jedoch gezeigt werden, dass die singuläre Applikation einer hohen Dosis den größten Effekt auf die Wundheilung hat. Bei der Untersuchung der Frakturheilung konnte ein stimulierender Effekt einer niedrig dosierten Therapie mit EPO bei ausgewachsenen Mäusen nachgewiesen werden [22,47].

Die Behandlungsdauer der Versuchstiere in der vorliegenden Arbeit wurde auf zwei beziehungsweise fünf Wochen festgelegt. Hierdurch konnte sowohl ein kurzfristiger, als auch ein langfristiger Effekt von EPO auf die Knochenheilung untersucht werden. Diesbezüglich muss beachtet werden, dass die Knochenregenerationsrate bei der Maus wesentlich schneller verläuft als beim Menschen [76]. Maningrasso und O'Connor untersuchten 2004 in einem Marknagel-Modell den zeitlichen Ablauf der ungestörten Frakturheilung an der Maus [70]. Es zeigte sich eine maximale Kallusbildung nach zwei Wochen. Dementsprechend wurde dieser Zeitpunkt in der vorliegenden Studie für die Untersuchung der frühen Knochenheilung gewählt. In der erwähnten Studie von Maningrasso und O'Connor (2004) konnte bei den meisten Versuchstieren nach 28 Tagen eine knöcherne Durchbauung des Frakturkallus und nach sechs Wochen ein Remodeling beobachtet werden. Da in der Studie von Maningrasso und O'Connor (2004) eine physiologische Frakturheilung ohne Ischämie untersucht wurde, haben wir die Knochenheilung in der hier vorliegenden Studie zusätzlich nach fünf Wochen untersucht. Entsprechend der Auswertung des Goldberg-Scores sowie der biomechanischen und histologischen Untersuchungen bestätigte sich zu diesem Zeitpunkt retrospektiv in allen Kontrolltieren das Bild einer gestörten Frakturheilung.

Im Anschluss an die jeweiligen Beobachtungszeiträume erfolgte die Tötung der Tiere mit Explantation der Knochen zur weiteren biomechanischen, radiologischen, histomorphometrischen und proteinbiochemischen Untersuchung. Prinzipiell ist es auch möglich, mittels verschiedener Bildgebungsverfahren die Knochenheilung am lebenden Tier zu untersuchen. Techniken wie beispielsweise Micro-Positronen-Emissions-Tomographie oder Micro-Magnetresonanztomographie sowie innovative Verfahren der molekularen Nukleartomographie bieten diesbezüglich neue

Möglichkeiten zur Darstellung und Untersuchung der Gewebemorphologie, Genexpression, Proteindegradation und Zellmigration in lebenden Tieren [111].

Die Biegesteifigkeit als biomechanischer Parameter beider Knochen eines jeweiligen Tieres aus Medikamenten- und Kontrollgruppe wurde mittels zerstörungsfreier 3-Punkt-Biegung gemessen. Dies ist ein etabliertes Verfahren und bietet den Vorteil, dass die getesteten Knochen im Anschluss noch für weitere Untersuchungen verwendet werden können, wodurch sich die Anzahl an Versuchstieren minimieren lässt. Zwar erlauben andere biomechanische Analysen wie z. B. die Rotationstestung die Untersuchung weiterer biomechanischer Parameter, doch gelingt dies nicht zerstörungsfrei. Alternativ kommt auch eine 4-Punkt-Biege-Testung, deren Versuchsaufbau die Möglichkeit einer Messung über eine definierte Strecke anstatt eines einzelnen Punktes bietet, in Frage. Jedoch eignen sich murine Femora mit einer durchschnittlichen Länge von etwa 17 mm für dieses Verfahren nicht [101]. Radiologische Analysetechniken erlauben durch zwei- und dreidimensionale Techniken eine objektive, quantifizierbare Analyse der Knochenheilung. Als Beispiel einer solchen standardisierten Analysetechnik ist der hier verwendete Goldberg-Score zu nennen [26]. Er erlaubte zuverlässig die Beurteilung einer knöchernen Überbrückung des Frakturspaltes. Die Schnittbildgebung wie z. B. das in dieser Arbeit verwendete Micro-CT, stellt durch seine hochauflösende Bildgebung eine noch genauere Möglichkeit der Quantifizierbarkeit des Kallus dar. Gemäß Morgan et al. (2009) [79] konnten diverse Untersuchungsparameter mittels Micro-CT erhoben werden, welche zur Beurteilung der knöchernen Durchbauung, Kallusgröße und Qualität der biomechanischen Eigenschaften der Knochen geeignet sind.

Die histologische Untersuchung der Knochenheilung stellt den Goldstandard der Analysetechnik dar [24]. In der vorliegenden Arbeit wurden gemäß Gerstenfeld et al. [24] zur histomorphometrischen Untersuchung sagittale, longitudinale histologische Schnitte im maximalen Durchmesser der Knochen angefertigt. Diese Form der histomorphometrischen Quantifizierung der Knochenheilung wird standardmäßig eingesetzt, um reproduzierbare histologische Schnitte der heterogenen, dreidimensionalen Struktur des Knochendefekts anfertigen zu können. Dabei wurden die digitalisierten histologischen Präparate computergestützt vermessen und anhand der Datensätze die verschiedenen Parameter bestimmt. Diese Technik war reproduzierbar und ermöglichte eine standardisierte Analyse der gesamten Kallusstruktur. Sie war im Gegensatz zur Röntgen- und Micro-CT Analyse nicht auf röntgendichte Strukturen begrenzt.

Zur proteinbiochemischen Analyse des Kallusgewebes erfolgte das Western Blotting. Voraussetzung für die Durchführbarkeit ist die Entnahme einer ausreichenden Menge des Kallusgewebes. Auf Grund des bereits begonnenen Remodelingprozesses konnte nach fünfwöchiger Heilungsphase meist nicht genügend Kallusgewebe extrahiert werden, sodass wir in der vorliegenden Arbeit diese Analyse lediglich nach 2 Wochen durchgeführt haben.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Gabe von EPO die Frakturheilung unter ischämischen Bedingungen signifikant beeinflusst. Während die Erzeugung einer milden Ischämie zu einer verzögerten Frakturheilung im vorliegenden Modell führte, konnte die intraperitoneale Applikation von EPO eine Verbesserung der Knochenheilung bewirken. In der Analyse der Röntgenbilder zeigte sich eine bessere knöcherne Überbauung des Frakturspalt. Biomechanisch zeigte sich eine höhere Biegesteifigkeit 5 Wochen postoperativ. Die verbesserte Knochenheilung durch die Gabe von EPO konnte auch histologisch nachgewiesen werden. Der Anteil an Knochengewebe war höher, der Anteil an Bindegewebe im Kallus vermindert. In der Micro-CT Untersuchung zeigte sich 2 Wochen postoperativ ein größeres Knochenvolumen. In den Western Blot Analysen zeigte sich eine erhöhte Expression des multipotenten, angio- und osteogenen CYR61 sowie ein beschleunigtes Remodeling durch die gesteigerte Expression von OPG und RANKL als Regulatoren des Knochenumbaus.

Die Knochenheilung unter ischämischen Bedingungen zeigt einen deutlich anderen Verlauf als die physiologische Knochenheilung [66]. So führt die verminderte Perfusion zu einer geringeren Zellproliferation in der Frühphase der Frakturheilung. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer geringeren Differenzierung von Zellen. Dadurch entsteht ein kleinerer Frakturkallus sowie mehr fibröses und adipogenes Gewebe im Bereich der Fraktur. Die Folge ist eine verzögerte oder gar ausbleibende Knochenheilung [17].

Interessanterweise konnte für EPO eine Stimulation der Zellproliferation in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen werden [62,87,91,99,106].

Im Knochen konnte eine erhöhte Expression des EPO-Rezeptors EPOR während der Differenzierung von Osteoblasten nachgewiesen werden [36]. Zudem konnte bei der

Gabe von EPO in vitro eine vermehrte osteogene Differenzierung und Mineralisierung in Osteoblasten im humanen und tierischen Knochenmarkt gezeigt werden [29,60].

Auch im Tiermodell konnten schon frühere Studien sowohl im offenen Frakturmodell als auch im geschlossenen Frakturmodell [45] einen positiven Effekt von EPO auf die Frakturheilung nachweisen. Generell wird für die Frakturheilung unter der Gabe von EPO ein erhöhtes Kallusvolumen, ein erhöhter mineralisierter Kallusanteil, eine beschleunigte knöcherne Überbrückung des Frakturspalt und verbesserte biomechanische Eigenschaften beschrieben [7,45,75,92].

So konnten Holstein et al. 2011 [47] in einem Pseudarthrosemodell der Maus zeigen, dass nach Gabe von EPO 10 Wochen postoperativ sowohl in den histologischen Untersuchungen als auch in den Micro-CT Untersuchungen der Frakturspalt eine bessere knöcherne Überbauung im Vergleich zur Kontrolle aufwies.

Garcia et al. [22] konnten ebenfalls eine verbesserte Knochenheilung in einem offenen Osteotomiemodell mit einem Frakturspalt von 0,25 mm nachweisen. Vergleichbar mit unseren Ergebnissen konnten die Autoren mehr Knochen und weniger Bindegewebe im Osteotomiespalt respektive Frakturspalt nachweisen. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen zeigte sich zudem ein geringerer Anteil an Knorpelgewebe.

In der hier vorliegenden Studie konnten wir ebenfalls zeigen, dass EPO auch unter ischämischen Bedingungen die Knochenheilung verbessert. Vor allem der Remodelingprozess war im Vergleich zu den Kontrollgruppen beschleunigt.

Die Tiere, die mit EPO behandelt wurden, zeigten 2 Wochen postoperativ in der CT-Analyse ein signifikant größeres Kallusvolumen sowie einen höheren Anteil an absolutem Knochenvolumen. Nach 5 Wochen Frakturheilung war der Kallus jedoch signifikant kleiner, mit einem geringen Anteil an absolutem Knochenvolumen. Dies spricht insgesamt für ein beschleunigtes Remodeling. Das Remodeling des Knochens führt durch Umwandlung der Knochenstruktur zu einer höheren Stabilität. Im Vergleich mit anderen Arbeiten [22,45], konnten wir ebenfalls eine signifikant höhere Biegesteifigkeit in der späten Phase der Frakturheilung nachweisen.

Die biomechanischen Eigenschaften eines heilenden Knochens stellen ein wichtiges Merkmal zur Beurteilung der Qualität des Knochengewebes im Heilungsverlauf dar. Die Ergebnisse der vorliegenden biomechanischen Analyse bestätigen hierbei die

Ergebnisse aus früheren Studien zur Frakturheilung im Mausmodell, die einen positiven Effekt auf die Knochenheilung nach Applikation von EPO nachwiesen [22].

In den histologischen Untersuchungen konnten wir zeigen, dass der Kallus der Kontrolltiere während der Frakturheilung unter ischämischen Bedingungen mehr Bindegewebe und weniger Knochen aufwies, was für eine gestörte Frakturheilung spricht [14,34,66,84]. Dies war sowohl in der frühen als auch in der späten Phase der Frakturheilung nachweisbar. Vergleichbare Ergebnisse konnten Lu et al. nachweisen [68]. In ihrer Studie haben sie die Auswirkungen unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen in der Atemluft von Mäusen mit Tibiafrakturen auf die Frakturheilung sowie als mögliche Therapie für Pseudarthrosen getestet. Die Autoren fanden eine vermehrte Infiltration des Knochenmarks auf Höhe der Fraktur durch Fettgewebe und eine vermehrte Anreicherung von Bindegewebe im Kallus. Die Autoren argumentierten, dass die Hypoxie des umgebenden Gewebes zu einer Unterdrückung der Differenzierung osteogener Zelltypen und zur Stimulation und Differenzierung adipöser und bindegewebiger Zelllinien führt. Hiram-Bab et al. [37] haben in ihrer Übersichtsstudie zum aktuellen Wissensstand bezüglich der Wirkmechanismen von EPO auf zellulärer Ebene während der Frakturheilung die wichtigsten Fakten, basierend auf Studien der letzten Jahre, zusammengestellt. EPO induziert osteogene Differenzierung und Mineralisierung in Osteoblasten des Knochenmarks in vitro sowohl in tierischen als auch menschlichen Zellen [29,52,60,93]. Bezüglich der Wirkweise von EPO bei der Frakturheilung gibt es durchaus kontrovers diskutierte Studien [96]. Im Allgemeinen werden jedoch Effekte wie ein vermehrtes Kallusvolumen bei erhöhtem Anteil mineralisierten Gewebes, beschleunigte Überbrückung des Frakturspaltes sowie verbesserte biomechanische Eigenschaften beschrieben [22,45,47,75,92,108].

Die radiologisch, biomechanisch und histologisch nachgewiesene verbesserte Knochenheilung durch EPO in der vorliegenden Arbeit wird wahrscheinlich durch die erhöhte Expression von CYR61 vermittelt.

Verschiedene Studien konnten nachweisen, dass CYR61 die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten stimuliert [4,30,61,97]. So konnten z. B. Si et al. 2006 nachweisen, dass eine Hemmung der Expression von CYR61 zu einer signifikant verminderten Wnt3A induzierten Differenzierung der Osteoblasten führt.

In einer früheren Studie untersuchte unsere Arbeitsgruppe den Einfluss von Sildenafil, einem Phosphodiesterasehemmer, auf die Knochenbruchheilung [40]. Die

Behandlung mit Sildenafil beschleunigte ebenfalls über einen durch CYR61 vermittelten Mechanismus den Remodelingprozess. Es ist davon auszugehen, dass CYR61 in der Lage ist, über eine osteogene Regulation die Frakturheilung zu beeinflussen.

CYR61 spielt auch eine wichtige Rolle während der chondrogenen Phase der Frakturheilung. So konnten Hadjiargyrou et al. [30] zeigen, dass die Expression von CYR61 mit der Phase der Chondrogenese korreliert. Dies konnte auch in einer Studie von Wan et al. [108] nachgewiesen werden. Im Kallus der mit EPO behandelten Tiere war der Knorpelanteil im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höher. Dies steht im Gegensatz zu unserer Studie. Der Anteil an Knorpelgewebe war in beiden Gruppen vergleichbar. Es ist anzunehmen, dass die ischämischen Bedingungen Einfluss auf die Chondrogenese nehmen.

You et al. [113] konnten zeigen, dass die Expression von CYR61 in retinalen Gefäß-Endothelzellen unter Hypoxie erhöht ist. In der vorliegenden Arbeit konnten wir eine vermehrte Expression von CYR61 in der EPO-Gruppe nachweisen. Der Unterschied war im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant. Daher vermuten wir, dass EPO die Expression von CYR61 positiv beeinflusst. Bisher existieren keine Arbeiten, die eine mögliche Beeinflussung der Ausschüttung von CYR61 durch EPO untersucht haben.

Die Expression von CYR61 wird durch die Hypoxie-vermittelte Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren wie dem Aktivator-Protein AP-1 reguliert [16,32,69]. Patel et al. [88] konnten eine durch EPO vermittelte, erhöhte Bindungsaktivität der AP-1 DNA nachweisen. Auf Grundlage dieser Ergebnisse könnte EPO eine vermehrte Expression von CYR61 durch AP-1 vermittelt haben.

Darüber hinaus fand sich in der Western Blot Analyse der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Expression von OPG und RANKL in den mit EPO behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren. Beide Faktoren nehmen eine Schlüsselrolle beim Remodelingprozess während der Knochenheilung ein [10,20,57,86,98]. Während RANKL durch Bindung von RANK auf Osteoklasten diese aktiviert, reduziert OPG diese Wirkung durch Inaktivierung von RANKL. Beide Faktoren wirken daher antagonistisch.

So konnten Gerstenfeld et al. [24] zeigen, dass die Hemmung von RANKL den Remodelingprozess während der Frakturheilung beeinträchtigt. In den histologischen Untersuchungen zeigte sich ein erhöhter Anteil an Knorpelgewebe. Somit kann

postuliert werden, dass EPO im Ischämiemodell den Remodelingprozess durch eine vermehrte Expression von RANKL beschleunigt.

Orth et al. [85] konnten nachweisen, dass eine Verbesserung der Angiogenese bei Pseudarthrosen unter anderem ein Ungleichgewicht des Verhältnisses von OPG/RANKL bewirkt hat [85], was zu einer verzögerten Heilung führte. Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass EPO die Expression von RANKL steigert. Fazzalari et al. [20] konnten zeigen, dass die Proliferation von RANKL der entscheidende Faktor für die Resorption von trabekulärem Knochen ist. Vor dem Hintergrund, dass das Remodeling des Knochens während der Frakturheilung durch die von RANKL geförderte Resorption beginnt, schließen die Autoren, dass RANKL als entscheidender Faktor das Remodeling beeinflusst.

Andere Arbeiten konnten zeigen, dass EPO die Expression von VEGF beeinflusst [47]. So konnte bereits nachgewiesen werden, dass EPO eine Stimulation der Geweberegeneration nach Hautverletzungen und myokardialer Ischämie über VEGF-vermittelte Signalwege induziert [102].

VEGF ist ein Signalmolekül, welches nachweislich die Ausbildung kollateraler Gefäße in ischämischen Extremitäten fördert [103] und nimmt eine Schlüsselrolle in der Phase der frühen Frakturheilung ein. Neben einem angiogenen Effekt, fördert VEGF auch die Osteoblastogenese [12,33]. Interessanterweise konnten Holstein et al. (2011) nachweisen, dass die Applikation von EPO die Expression von VEGF auch im Rahmen der Knochenheilung stimuliert [47]. In der vorliegenden Studie zeigte sich ebenfalls eine deutlich erhöhte Expression von VEGF in Tieren, die mit EPO behandelt wurden. Jedoch war dieser Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass eine Hypoxie als starker Stimulus für eine erhöhte VEGF Expression wirkt [21,59,64]. In dem hier angewandten ischämischen Tiermodell könnte daher auch in Tieren der Kontrollgruppe eine erhöhte Expression von VEGF vorgelegen haben, sodass sich trotz EPO-vermittelter Expression von VEGF in der Erythropoietingruppe statistisch keine Signifikanz zwischen beiden Gruppen ergab. Möglicherweise hätte eine höhere Dosis von EPO die Expression von VEGF gesteigert.

Interessanterweise hatte die Behandlung mit EPO keinen Einfluss auf die Expression von BMP-2 und BMP-4. Beide Proteine haben eine bedeutende Rolle in der Knochenheilung und wirken osteogen [85]. Die Wirkung von EPO wird durch den EPO-Rezeptor EPOR vermittelt, der zur Familie der hämatopoetischen, zytokinen

und Wachstumsfaktor-Rezeptoren gehört [48]. Shiozawa et al. [95] konnten zeigen, dass EPO sowohl in vitro als auch in vivo die Expression von BMP-2 in hämatopoetischen Stammzellen erhöht [50]. Dieser Effekt konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Die Ischämie könnte diesem Effekt entgegengewirkt haben. Die Tatsache, dass weder die Expression von BMP-2, noch von BMP-4 nach Gabe von EPO im Ischämiemodell erhöht war, lässt postulieren, dass die osteogene Wirkung von EPO in diesem Modell über andere Signalwege vermittelt wird.

6 Literaturverzeichnis

1. Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J (1998) Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* 139:663–670
2. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L (1997) A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390:175
3. Aumüller G, Aust G, Doll A (2010) *Duale Reihe Anatomie*. 2. Auflage edition. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
4. Babic AM, Kireeva ML, Kolesnikova TV, Lau LF (1998) CYR61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci* 95:6355–6360
5. Beck A, Krischak G, Sorg T, Augat P, Farker K, Merkel U, Kinzl L, Claes L (2003) Influence of diclofenac (group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs) on fracture healing. *Arch Orthop Trauma Surg* 123:327–332
6. Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S (2016) *Duale Reihe Physiologie*. 3. Auflage edition. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
7. Betsch M, Thelen S, Santak L, Herten M, Jungbluth P, Miersch D, Hakimi M, Wild M (2014) The role of erythropoietin and bone marrow concentrate in the treatment of osteochondral defects in mini-pigs. *PloS One* 9:e92766
8. Boachang Q, Tiecheng Y (2016) Mouse fracture models: a primer. *Int J Clin Exp Med* 7:12418–12429
9. Bonnarens F, Einhorn TA (1984) Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res* 2:97–101
10. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, others (1998) Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12:1260–1268
11. Burgis E (2005) *Intensivkurs Allgemeine und Spezielle Pharmakologie*. 3. Auflage edition. Urban & Fischer Verlag, München

12. Carano RAD, Filvaroff EH (2003) Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 8:980–989
13. Cheung KMC, Kaluarachi K, Andrew G, Lu W, Chan D, Cheah KSE (2003) An externally fixed femoral fracture model for mice. *J Orthop Res* 21:685–690
14. Choi P, Ogilvie C, Thompson Z, Miclau T, Helms JA (2004) Cellular and Molecular Characterization of a Murine Non-Union Model. *J Orthop Res* 22:1100–1107
15. Claes L, Schmalenbach J, Herrmann M, Olkū I, Garcia P, Histing T, Obeid R, Schorr H, Herrmann W, Pohlemann T, Menger MD, Holstein JH (2009) Hyperhomocysteinemia is associated with impaired fracture healing in mice. *Calcif Tissue Int* 85:17–21
16. Cummins EP, Taylor CT (2005) Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch* 450:363–371
17. Dickson KF, Katzman S, Paiement G (1995) The importance of the blood supply in the healing of tibial fractures. *Contemp Orthop* 30:489–493
18. Einhorn TA (2005) The science of fracture healing. *J Orthop Trauma* 19:4–6
19. Eschbach JW, Haley NR, Adamson JW (1990) The anemia of chronic renal failure: pathophysiology and effects of recombinant erythropoietin. *Contrib Nephrol* 78:24–37
20. Fazzalari NL (2011) Bone Fracture and Bone Fracture Repair. *Osteoporos Int* 22:2003–2006
21. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16:4604–4613
22. Garcia P, Speidel V, Scheuer C, Laschke MW, Holstein JH, Histing T, Pohlemann T, Menger MD (2011) Low dose erythropoietin stimulates bone healing in mice. *J Orthop Res* 29:165–172
23. Garcia P, Menger MD (2013) Rodent Animal Models of Delayed Bone Healing and Non-Union Formation: A Comprehensive Review. *Eur Cell Mater* 26:1–14

24. Gerstenfeld LC ET (2005) Application of histomorphometric methods to the study of bone repair. *J Bone Min Res* 20:1715–1722
25. Ghiasi MS, Chen J, Vaziri A, Rodriguez EK, Nazarian A (2017) Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods. *Bone Rep* 6:87–100
26. Goldberg VM, Powell A, Shaffer JW, Zika J, Bos GD, Heiple KG (1985) Bone grafting: role of histocompatibility in transplantation. *J Orthop Res* 3:389–404
27. Graefe K, Lutz W, Bönisch H (2016) Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie. 2. Auflage edition. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
28. Gröngröft I, Heil P, Matthys R, Lezuo P, Tami A, Perren S, Montavon P, Ito K (2009) Fixation compliance in a mouse osteotomy model induces two different processes of bone healing but does not lead to delayed union. *J Biomech* 42:2089–2096
29. Guo L, Luo T, Fang Y, Yang L, Wang L, Liu J, Shi B (2014) Effects of erythropoietin on osteoblast proliferation and function. *Clin Exp Med* 14:69–76
30. Hadjiargyrou M, Ahrens W, Rubin CT (2000) Temporal expression of the chondrogenic and angiogenic growth factor CYR61 during fracture repair. *J Bone Miner Res* 15:1014–1023
31. Haffner-Luntzer M, Kovtun A, Rapp AE, Ignatius A (2016) Mouse Models in Bone Fracture Healing Research. *Curr Mol Bio Rep* 2:101–111
32. Han J-S, Macarak E, Rosenbloom J, Chung KC, Chaqour B (2003) Regulation of Cyr61/CCN1 gene expression through RhoA GTPase and p38MAPK signaling pathways. *Eur J Biochem* 270:3408–3421
33. Hankenson KD, Dishowitz M, Gray C, Schenker M (2011) Angiogenesis in bone regeneration. *Injury* 42:556–561
34. Hausman MR, Schaffler MB, Majeska RJ (2001) Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone* 29:560–564
35. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Herausgeber (2014) Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9. Auflage edition. Springer, Berlin

36. Hiram-Bab S, Liron T, Deshet-Unger N, Mittelman M, Gassmann M, Rauner M, Franke K, Wielockx B, Neumann D, Gabet Y (2015) Erythropoietin directly stimulates osteoclast precursors and induces bone loss. *FASEB J* 29:1890–1900
37. Hiram-Bab S, Neumann D, Gabet Y (2017) Erythropoietin in bone - Controversies and consensus. *Cytokine* 89:155–159
38. Histing T, Holstein JH, Garcia P, Matthys R, Kristen A, Claes L, Menger MD, Pohlemann T (2009) Ex vivo analysis of rotational stiffness of different osteosynthesis techniques in mouse femur fracture. *J Orthop Res* 27:1152–1156
39. Histing T, Garcia P, Matthys R, Leidinger M, Holstein JH, Kristen A, Pohlemann T, Menger MD (2010) An internal locking plate to study intramembranous bone healing in a mouse femur fracture model. *J Orthop Res* 28:397–402
40. Histing T, Marciniak K, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Pohlemann T, Menger MD (2011) Sildenafil accelerates fracture healing in mice. *J Orthop Res* 29:867–873
41. Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, Steck R, Laschke MW, Wehner T, Bindl R, Recknagel S, Stuermer EK, Vollmar B, Wildemann B, Lienau J, Willie B, Peters A, Ignatius A, Pohlemann T, Claes L, Menger MD (2011) Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 49:591–599
42. Histing T, Anton C, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Pohlemann T, Menger MD (2012) Melatonin impairs fracture healing by suppressing RANKL-mediated bone remodeling. *J Surg Res* 173:83–90
43. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA (2004) Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 56:549–580
44. Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C, Pohlemann T (2007) Development of a locking femur nail for mice. *J Biomech* 215–219
45. Holstein JH, Menger MD, Scheuer C, Meier C, Culemann U, Wirbel RJ, Garcia P, Pohlemann T (2007) Erythropoietin (EPO): EPO-receptor signaling improves early endochondral ossification and mechanical strength in fracture healing. *Life Sci* 80:893–900

46. Holstein JH, Matthys R, Histing T, Becker SC, Fiedler M, Garcia P, Meier C, Pohlemann T, Menger MD (2009) Development of a stable closed femoral fracture model in mice. *J Surg Res* 153:71–75
47. Holstein JH, Orth M, Scheuer C, Tami A, Becker SC, Garcia P, Histing T, Mörsdorf P, Klein M, Pohlemann T, Menger MD (2011) Erythropoietin stimulates bone formation, cell proliferation, and angiogenesis in a femoral segmental defect model in mice. *Bone* 49:1037–1045
48. Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Thierfelder WE, Kreider B, Silvennoinen O (1994) Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends Biochem Sci* 19:222–227
49. Jelkmann W (1992) Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 72:449–489
50. Jung Y, Song J, Shiozawa Y, Wang J, Wang Z, Williams B, Havens A, Schneider A, Ge C, Franceschi RT, McCauley LK, Krebsbach PH, Taichman RS (2008) Hematopoietic stem cells regulate mesenchymal stromal cell induction into osteoblasts thereby participating in the formation of the stem cell niche. *Stem Cells Dayt Ohio* 26:2042–2051
51. Kearns AE (2008) RANKL and OPG regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev* 29:1601–1612
52. Kim J, Jung Y, Sun H, Joseph J, Mishra A, Shiozawa Y, Wang J, Krebsbach PH, Taichman RS (2012) Erythropoietin mediated bone formation is regulated by mTOR signaling. *J Cell Biochem* 113:220–228
53. Krischak GD, Augat P, Blakytyn R, Claes L, Kinzl L, Beck A (2007) The non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac reduces appearance of osteoblasts in bone defect healing in rats. *Arch Orthop Trauma Surg* 127:453–458
54. Krischak GD, Augat P, Sorg T, Blakytyn R, Kinzl L, Claes L, Beck A (2007) Effects of diclofenac on periosteal callus maturation in osteotomy healing in an animal model. *Arch Orthop Trauma Surg* 127:3–9
55. Krishnakumar GS, Roffi A, Reale D, Kon E, Filardo G (2017) Clinical application of bone morphogenetic proteins for bone healing: a systematic review. *Int Orthop* 41:1073–1083

56. Kuhn JL, Goldstein SA, Ciarelli MJ, Matthews LS (1989) The limitations of canine trabecular bone as a model for human: a biomechanical study. *J Biomech* 22:95–107
57. Lacey DL, Timms E, Tan H-L, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, others (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93:165–176
58. Lertkietmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ (2016) Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol* 23:253–259
59. Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA (1995) Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem* 270:13333–13340
60. Li C, Shi C, Kim J, Chen Y, Ni S, Jiang L, Zheng C, Li D, Hou J, Taichman RS, Sun H (2015) Erythropoietin promotes bone formation through EphrinB2/EphB4 signaling. *J Dent Res* 94:455–463
61. Lienau J, Schell H, Epari DR, Schütze N, Jakob F, Duda GN, Bail HJ (2006) CYR61 (CCN1) protein expression during fracture healing in an ovine tibial model and its relation to the mechanical fixation stability. *J Orthop Res* 24:254–262
62. Lipsic E, Schoemaker RG, van der Meer P, Voors AA, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH (2006) Protective effects of erythropoietin in cardiac ischemia: from bench to bedside. *J Am Coll Cardiol* 48:2161–2167
63. Lissenberg-Thunnissen SN, de Gorter DJJ, Sier CFM, Schipper IB (2011) Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Int Orthop* 35:1271–1280
64. Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S (1995) Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res* 77:638–643
65. Lu C, Marcucio R, Miclau T (2006) Assessing Angiogenesis during Fracture Healing. *Iowa Orthop J* 26:17–26
66. Lu C, Miclau T, Hu D, Marcucio RS (2007) Ischemia leads to delayed union during fracture healing: a mouse model. *J Orthop Res* 25:51–61

67. Lu C, Saless N, Hu D, Wang X, Xing Z, Hou H, Williams B, Swartz HM, Colnot C, Miclau T, Marcucio RS (2011) Mechanical Stability Affects Angiogenesis during Early Fracture Healing. *J Orthop Trauma* 25:494–499
68. Lu C, Saless N, Wang X, Sinha A, Decker S, Kazakia G, Hou H, Williams B, Swartz HM, Hunt TK, Miclau T, Marcucio RS (2013) The role of oxygen during fracture healing. *Bone* 52:220–229
69. Lukiw WJ, Ottlecz A, Lambrou G, Grueninger M, Finley J, Thompson HW, Bazan NG (2003) Coordinate Activation of HIF-1 and NF- κ B DNA Binding and COX-2 and VEGF Expression in Retinal Cells by Hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:4163–4170
70. Manigrasso MB, O'Connor JP (2004) Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J Orthop Trauma* 18:687–695
71. Marsell R, Einhorn TA (2011) The biology of fracture healing. *Injury* 42:551–555
72. Martini L, Fini M, Giavaresi G, Giardino R (2001) Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comp Med* 51:292–299
73. Matthys R, Perren SM (2009) Internal fixator for use in the mouse. *Injury* 40:103–109
74. McKibbin B (1978) The Biology of Fracture Healing in Long Bones. *J Bone Jt Surg* 60:150–162
75. Mihmanli A, Dolanmaz D, Avunduk MC, Erdemli E (2009) Effects of recombinant human erythropoietin on mandibular distraction osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg* 67:2337–2343
76. Mills LA, Simpson AH (2012) In vivo models of bone repair. *J Bone Jt Surg Br* 94:865–874
77. Miyake T, Kung CK, Goldwasser E (1977) Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 252:5558–5564
78. Miyamoto T, Suda T (2003) Differentiation and function of osteoclasts. *Keio J Med* 52:1–7
79. Morgan EF, Mason ZD, Chien KB, Pfeiffer AJ, Barnes GL, Einhorn TA, Gerstenfeld LC (2009) Micro-computed tomography assessment of fracture

- p healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function.
- Bone*
- 44:335–344
80. Müller ME, Nazarian S, Koch P, Schatzker J (2012) *The Comprehensive Classification of Fractures of Long Bones*. 1. Auflage edition. Springer, Berlin, Heidelberg
 81. Newman E, Turner AS, Wark JD (1995) The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone* 16:277–284
 82. Nunamaker DM (1998) Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* 355:56–65
 83. Nurko S (2006) Anemia in chronic kidney disease: causes, diagnosis, treatment. *Cleve Clin J Med* 73:289–297
 84. Oni OO (1995) A non-union model of the rabbit tibial diaphysis. *Injury* 26:619–622
 85. Orth M, Shadmanov T, Scheuer C, Braun BJ, Fritz T, Holstein JH, Histing T, Laschke MW, Pohlemann T, Menger MD (2018) Marble-derived microcalcite improves bone healing in mice osteotomy. *Biomed Mater Bristol Engl* 14:025001
 86. Orth M, Baudach J, Scheuer C, Osche D, Veith NT, Braun BJ, Rollmann MF, Herath SC, Pohlemann T, Menger MD, Histing T (2019) Erythropoietin does not improve fracture healing in aged mice. *Exp Gerontol* 122:1–9
 87. Pankratova S, Kiryushko D, Sonn K, Soroka V, Køhler LB, Rathje M, Gu B, Gotfryd K, Clausen O, Zharkovsky A, Bock E, Berezin V (2010) Neuroprotective properties of a novel, non-haematopoietic agonist of the erythropoietin receptor. *Brain J Neurol* 133:2281–2294
 88. Patel HR, Sytkowski AJ (1995) Erythropoietin activation of AP1 (Fos/Jun). *Exp Hematol* 23:619–625
 89. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG (2007) Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 13:1–10
 90. Percy Frey S, Dohr S, Eden L, Dannigkeit S, Schuetze N, Meffert R, Jansen H (2012) Cysteine-rich matricellular protein improves callus regenerate in a rabbit trauma model. *Int Orthop* 36:2387–2393

91. Rex TS, Wong Y, Kodali K, Merry S (2009) Neuroprotection of photoreceptors by direct delivery of erythropoietin to the retina of the retinal degeneration slow mouse. *Exp Eye Res* 89:735–740
92. Rölting JHD, Bendtsen M, Jensen J, Stiehler M, Foldager CB, Hellfritsch MB, Bünger C (2012) Erythropoietin augments bone formation in a rabbit posterolateral spinal fusion model. *J Orthop Res* 30:1083–1088
93. Rölting JHD, Baatrup A, Stiehler M, Jensen J, Lysdahl H, Bünger C (2014) The osteogenic effect of erythropoietin on human mesenchymal stromal cells is dose-dependent and involves non-hematopoietic receptors and multiple intracellular signaling pathways. *Stem Cell Rev* 10:69–78
94. Röntgen V, Blakytyn R, Matthys R, Landauer M, Wehner T, Göckelmann M, Jermendy P, Amling M, Schinke T, Claes L, Ignatius A (2010) Fracture healing in mice under controlled rigid and flexible conditions using an adjustable external fixator. *J Orthop Res* 28:1456–1462
95. Shiozawa Y, Jung Y, Ziegler AM, Pedersen EA, Wang J, Wang Z, Song J, Wang J, Lee CH, Sud S, Pienta KJ, Krebsbach PH, Taichman RS (2010) Erythropoietin couples hematopoiesis with bone formation. *PloS One* 5:e10853
96. Shiozawa Y, Taichman R (2015) Bone: Elucidating which cell erythropoietin targets in bone. *Nat Rev Endocrinol* 11:263–264
97. Si W, Kang Q, Luu HH, Park JK, Luo Q, Song W-X, Jiang W, Luo X, Li X, Yin H, Montag AG, Haydon RC, He T-C (2006) CCN1/Cyr61 is regulated by the canonical Wnt signal and plays an important role in Wnt3A-induced osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *Mol Cell Biol* 26:2955–2964
98. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang M-S, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, others (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309–319
99. Singbrant S, Russell MR, Jovic T, Liddicoat B, Izon DJ, Purton LE, Sims NA, Martin TJ, Sankaran VG, Walkley CR (2011) Erythropoietin couples erythropoiesis, B-lymphopoiesis, and bone homeostasis within the bone marrow microenvironment. *Blood* 117:5631–5642

100. Sorg H, Krueger C, Schulz T, Menger MD, Schmitz F, Vollmar B (2009) Effects of erythropoietin in skin wound healing are dose related. *FASEB J* 23:3049–3058
101. Steiner M, Volkheimer D, Meyers N, Wehner T, Wilke H-J, Claes L, Ignatius A (2015) Comparison between Different Methods for Biomechanical Assessment of Ex Vivo Fracture Callus Stiffness in Small Animal Bone Healing Studies. *PLoS ONE* 10:e0119603
102. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RAD, Filvaroff EH (2002) Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9656–9661
103. Takeshita S, Pu LQ, Stein LA, Sniderman AD, Bunting S, Ferrara N, Isner JM, Symes JF (1994) Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia. *Circulation* 90:228–234
104. Tang G, Charo DN, Wang R, Charo IF, Messina L (2004) CCR2^{-/-} knockout mice revascularize normally in response to severe hindlimb ischemia. *J Vasc Surg* 40:786–795
105. Thompson Z, Miclau T, Hu D, Helms JA (2002) A model for intramembranous ossification during fracture healing. *J Orthop Res* 20:1091–1098
106. Tsai PT, Ohab JJ, Kertesz N, Groszer M, Matter C, Gao J, Liu X, Wu H, Carmichael ST (2006) A Critical Role of Erythropoietin Receptor in Neurogenesis and Post-Stroke Recovery. *J Neurosci* 26:1269–1274
107. Ulfing N (2015) *Kurzlehrbuch Histologie*. 4. edition. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
108. Wan L, Zhang F, He Q, Tsang WP, Lu L, Li Q, Wu Z, Qiu G, Zhou G, Wan C (2014) EPO promotes bone repair through enhanced cartilaginous callus formation and angiogenesis. *PloS One* 9:e102010
109. Wang M, Yang N (2018) Three-dimensional computational model simulating the fracture healing process with both biphasic poroelastic finite element analysis and fuzzy logic control. *Sci Rep* 8:6744

110. Wang X, Mabrey JD, Agrawal CM (1998) An interspecies comparison of bone fracture properties. *Biomed Mater Eng* 8:1–9
111. Webb E, Yuan M, R Lemoine N, Wang Y (2016) Imaging in animal models. *Integr Cancer Sci Ther* 3:428–431
112. Wennemuth G, Herausgeber (2017) Taschenbuch Histologie. 2. Auflage edition. Urban & Fischer, München
113. You J-J, Yang C-M, Chen M-S, Yang C-H (2010) Regulation of Cyr61/CCN1 expression by hypoxia through cooperation of c-Jun/AP-1 and HIF-1 α in retinal vascular endothelial cells. *Exp Eye Res* 91:825–836

7 Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle gerne allen danken, die mich bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

Frau Prof. Dr. med. Tina Histing, meiner Doktormutter, danke ich sehr für die Überlassung des Themas sowie ihre einzigartige Unterstützung und große Hilfe bei der Durchführung der Arbeit. Sie stand mir stets mit hilfreichen Ratschlägen und konstruktiver Kritik zur Seite.

Herrn Prof. Dr. med. Michael D. Menger möchte ich für seine Hilfe bei der Durchführung meiner Arbeit, seine Ratschläge und das großzügige Bereitstellen der Räumlichkeiten und Gerätschaften danken.

Herrn Prof. Dr. med. Tim Pohlemann danke ich für die konstruktiven Ratschläge und Anregungen während der Durchführung der Arbeit.

Frau Dr. rer. nat. Claudia Scheuer und Frau Janine Becker möchte ich für die großartige Unterstützung bei der Durchführung der proteinbiochemischen und histologischen Analysen danken.

Frau Dr. med. vet. Monika Frings danke ich für die Unterstützung während den Tierversuchen.

Frau Janine Stutz und Herrn Benedikt Merscher danke ich für die gute Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung während der Durchführung der Tierversuche.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für klinisch-experimentelle Chirurgie für das stets angenehme Arbeitsklima.

Herrn Dr. med. David Stenger möchte ich für die großartige Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche sowie für die ständige Präsenz bei Fragen und immer konstruktive Anregungen.

Herrn Dr. med. Marcel Orth danke ich sehr für die Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn M.Sc. Paul Nikolaus gilt mein besonderer Dank für die großartige Unterstützung bei der Erstellung der Graphen sowie der Korrektur der Arbeit.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie, meinen Eltern und meiner Schwester sowie meinen Großeltern, für die Unterstützung während meines gesamten Studiums sowie darüber hinaus bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit bedanken.

Meiner Partnerin Lara danke ich für ihre bedingungslose Unterstützung, unsere berufliche und private Zusammenarbeit, ihre großartige Geduld und Motivation bei der Erstellung der Arbeit sowie darüber hinaus.

8 Publikationen

Die vorliegende Arbeit wurde auf untenstehendem Kongress präsentiert.

8.1 Vorträge

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, 23. – 26. Oktober 2018, Berlin, Deutschland:

Osche D, Stenger D, Stutz S, Bremer P, Rollmann M, Pohlemann T, Menger MD, Histing T. Der Einfluss von EPO auf die Frakturheilung im murinen Ischämiemodell.

8.2 Publikationen

Orth M, Baudach J, Scheuer C, **Osche D**, Veith NT, Braun BJ, Histing T (2019) Erythropoietin does not improve fracture healing in aged mice. Experimental gerontology 122:1-9.

Die Studie ist zur Veröffentlichung unter dem Titel „Erythropoietin improves bone healing in a femoral fracture model under ischemic conditions in mice“ geplant. Das Manuskript wird überarbeitet und in Kürze zur Publikation eingereicht.

Abbildungsverzeichnis

1	MouseScrew™	20
2	Inguinalregion der Maus, Vergrößerung unter dem Mikroskop	22
3	Hautschnitt Ischämie	22
4	Verlauf des Gefäß-Nervenbündels	22
5	Ligatur der Arteria femoralis	22
6	Fixation des Beines während der OP	24
7	Hautschnitt Osteosynthese	24
8	Kondylenmassiv	24
9	Aufbohren des Markraumes	24
10	Einführen der Kanüle mit Punktion der Rückenhaut	24
11	Intramedulläre Lage des Führungsdrahtes	24
12	Erzeugung der Fraktur	25
13	Einführen der MouseScrew™	25
14	Finale Lage der MouseScrew™	25
15	Adaptierung der Patellarsehne	25
16	Hautverschluss	25
17	Röntgenologische Kontrolle Führungsdraht	25
18	Röntgenologische Kontrolle Fraktur	26
19	Röntgenologische Abschlusskontrolle	26
20	Röntgenologische Heilungskontrolle	26
21	Röntgenologische Untersuchung der ausgebauten Femora	28
22	3-Punkt-Biege-Einrichtung und Kraft-Weg-Diagramm	28
23	Safranin-O Färbung	31
24	Micro-CT	32
25	Goldberg-Score	34
26	Biomechanik 2 Wochen	35
27	Biomechanik 5 Wochen	35
28	Biomechanik kontralaterale Knochen	36
29	Knocheanteil am periostalen Kallusgewebe	37
30	Bindegewebsanteil am periostalen Kallusgewebe	37
31	Knorpelanteil am periostalen Kallusgewebe	38
32	Absolutes Kallusvolumen	38
33	Absolutes Knochenvolumen innerhalb des Kallus	39
34	Anteil Knochenvolumen am Kallus	39
35	Trabecular Number	40
36	Trabecular Thickness	40

37 Trabecular Separation	41
38 Western Blot BMP-2	41
39 Western Blot BMP-4	42
40 Western Blot CD31	42
41 Western Blot CYR61	43
42 Western Blot VEGF	43
43 Western Blot OPG	44
44 Western Blot RANKL	44

Tabellenverzeichnis

1 Studiendesign	19
2 Goldberg-Score	27
3 Übersicht über die analysierten Parameter Micro-CT	31
4 Übersicht über die analysierten Proteine und deren Funktion	33